

Willian Alexandre Suguino

**DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA ESTUDOS
DA PRODUÇÃO DE SIDRAS DE ALTA QUALIDADE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Coorientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Suguino, Willian Alexandre
Desenvolvimento de tecnologias para estudos da
produção
de Sidras de alta qualidade [dissertação] / Willian
Alexandre Suguino ; orientador, Jorge Luiz Ninow ;
coorientador,
Márcio José Rossi. - Florianópolis, SC, 2012.
86 p. ; 21cm
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-
Graduação em
Engenharia de Alimentos.
Inclui referências
1. Engenharia de Alimentos. 2. Processos
biotecnológicos. 3. Sidra. 4. Encapsulação. I.
Ninow, Jorge
Luiz. II. Rossi, Márcio José. III. Universidade
Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

Willian Alexandre Suguino

**DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA ESTUDOS
DA PRODUÇÃO DE SIDRAS DE ALTA QUALIDADE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Florianópolis, 18 de dezembro de 2012.

Prof. João Borges Laurindo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Jorge Luiz Ninow, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Márcio José Rossi, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Alessandro Nogueira, Dr.
Universidade Estadual de Ponta
Grossa

Prof. Aparecido Lima da Silva,
Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof^a. Débora de Oliveira, Dr^a.
Universidade Federal de Santa
Catarina

**Dedico esta dissertação à todas as pessoas que de algum modo
contribuíram para a realização do trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Aos colegas dos Laboratórios de Bioprocessos, Microbiologia do Solo e Diversidade Microbiana.

Aos Professores Márcio J. Rossi e Jorge L. Ninow, pela orientação, apoio, compreensão.

Ao Professor Alessandro Nogueira, pela acolhida, ajuda com as análises e na elaboração do artigo.

Aos Professores Admir Giachini e Cláudio R. F. S. Soares do Departamento de Microbiologia, Infectologia e Parasitologia.

Ao Professor Rafael D. de Armas do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética.

Aos Professores e colegas da UEPG pela ótima recepção durante o período de estadia.

Aos Professores do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos.

Ao Douglas C. Cortez, pelo companheirismo no cotidiano do laboratório.

À Shantau C. G. Stoffel, pelo carinho e afeto desde esse último ano.

Ao Augusto C. Pola Jr. e Helio Nonose, pelo companheirismo nesses anos.

Aos meus pais pelo carinho, apoio e incentivo.

À FAPESC e CAPES, pelo apoio financeiro

À PGEAL, pela oportunidade de realização do trabalho.

Aos membros da Comissão Examinadora, pelas valiosas contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

No Brasil, eventos climáticos afetam uma quantidade da produção de maçãs que, juntamente com o processo de seleção, contabiliza cerca de 30 % da produção não aproveitada para consumo *in natura*. O baixo valor desse descarte evoca por alternativas para sua valorização como a elaboração de sidra. Nesse contexto, este trabalho visou à utilização de suco de maçã concentrado a fim de avaliar sua viabilidade para produção de sidras com perfil aromático característico aproveitando as vantagens de um material de fácil estocagem, manutenção e utilização. Sidras foram elaboradas a partir de 2 diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentadores de 50 L de capacidade sob pressão de 1 kgf.cm^{-2} durante 30 dias, filtradas, envasadas, estabilizadas quimicamente ou termicamente. A encapsulação de leveduras foi estudada como alternativa à fermentação em tanques pressurizados. São apresentados resultados para características físico-químicas e perfil de compostos voláteis relacionados com o aroma característico de sidras e para o material encapsulado produzido a partir de metodologia de gotejamento. Os resultados demonstraram a possibilidade do uso de suco de maçã concentrado para a produção de sidra com compostos aromáticos característicos. A cepa de levedura influenciou no perfil de compostos voláteis bem como o método de conservação. A conservação por processamento térmico reduziu compostos de *off-flavor* e aumentou compostos de aroma frutados. Material encapsulado apresentou células livres no meio após o fim do processo fermentativo.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, compostos voláteis, suco de maçã concentrado, processamento térmico, encapsulação.

ABSTRACT

In Brazil, climatic events pledge an amount of the production that added to the selection of the fruits accounts for about 30 % of the production that is not used for *in natura* consumption. The low value of this discard evocate for alternatives to enhance its value as the production of cider. In this context, this work aimed the use of concentrate apple juice to evaluate the feasibility of the production of characteristic aromatic profile ciders using the advantages of a raw material that is easy to store, keep and utilize. Ciders were produced using 2 different *Saccharomyces cerevisiae* strains in 50 L fermenter under 1 kgf.cm⁻² pressure during 30 days, filtered, bottled, chemically or thermically stabilized. The encapsulation of yeasts was studied as an alternative to pressurized tank methods. Results are shown for the physicochemical characteristics and volatile compounds profile related to the characteristic cider aroma and results for the encapsulated material produced by the dripping method. The results showed the possibility of the usage of concentrate apple juice for the production of cider with characteristic aromatic compounds. Yeast strain influenced in the volatile profile as well as conservation method. The conservation by thermal process reduced off-flavor and enhanced fruity flavor compounds. Encapsulated material showed free cells in the medium at the end of the fermentative process.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, volatile compounds, concentrate apple juice, thermal processing, encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biотecnologia: integração entre biodisciplinas e engenharia. Fonte: RIET e TRAMPER, 1991.	32
Figura 2	Reação entre o alginato e íons cálcio. Fonte: PASIN et al., 2012.	38
Figura 3	Fluxograma de desenvolvimento das bebidas fermentadas. CWoS – produzido em fermentador de 50 L sem adição de estabilizante microbiológico; CWS – produzido em fermentador de 50 L com adição de estabilizante microbiológico; CNP – produzido em fermentador de 50 L com adição de estabilizante microbiológico; CP – produzido em fermentador de 50 L com adição de estabilizante microbiológico e submetido à pasteurização a 70 °C/20 min.	47
Figura 4	Fluxograma de produção das cápsulas de alginato de cálcio, adaptado de Chan et al., 1996. *- não foi realizada em todos os ensaios.	52
Figura 5	Desenho do fermentador piloto de 50 L.	56
Figura 6	Imagem externa do equipamento construído com 50 L de capacidade, composto de câmara de fermentação, tampa e compartimento para controle de temperatura.	57
Figura 7	Vista superior da tampa do fermentador	57
Figura 8	Carcaça do sistema de filtração	58
Figura 9	Vista frontal da câmara de enchimento isobárica	58
Figura 10	Balanço de força na ponta de gotejamento baseada na lei de Tate. Fonte: LEE et al. (2008).	68
Figura 11	Posicionamento paralelo à solução de cloreto de cálcio da ponta de gotejamento.	68
Figura 12	Rompimento de camada externa de alginato em cápsula com 3 mm de diâmetro e liberação de células (depósito presente no fundo do tubo).	69
Figura 13	Cápsula de alginato de cálcio de cerca de 4,5 mm após 15 dias de fermentação	70
Figura 14	Imagem de lâmina do meio de cultura corado com azul de metileno para contagem de leveduras presentes totais e viáveis	70
Figura 15	Imagem do crescimento de leveduras fora da cápsula em meio de cultura YEPD sólido para verificação da viabilidade dos microrganismos (tratamento P200 20h).	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Soluções de geleificação utilizadas	53
----------	-------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da solução estoque de referência para análise dos compostos voláteis de fermentado de maçã.	50
Tabela 2	Análise Físico-química do mosto de maçã e de diferentes tratamentos de sidras. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para triplicatas. Médias com mesma letra não são significativamente diferentes ($p>0,05$).	64
Tabela 3	Análise cromatográfica de mosto de maçã e de diferentes tratamentos de sidras. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para duplicatas. Médias com mesma letra não são significativamente diferentes ($p>0,05$).	65
Tabela 4	Valores das dimensões das saídas de gotejamento utilizadas nos ensaios de encapsulação. São apresentados os valores médios \pm desvio padrão para cinco repetições.	67
Tabela 5	Característica de cápsulas produzidas por gotejamento por gravidade em solução de cloreto de cálcio 20 g.L^{-1} de acordo com as saídas de gotejamento. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para cinco repetições.	67
Tabela 6	Característica de cápsulas produzidas por gotejamento com auxílio de bomba peristáltica e curadas por diferentes tempos em solução de cloreto de cálcio 20 g.L^{-1} . Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para vinte repetições. Médias com mesma letra para a mesma saída de gotejamento não são significativamente diferentes.	69
Tabela 7	Contagem de leveduras viáveis em suco $13 \text{ }^\circ\text{Brix}$.	71
Tabela 8	Contagem de leveduras viáveis em suco $2,9 \text{ }^\circ\text{Brix}$.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade Antioxidante Total
ABPM – Associação Brasileira de Produtores de Maçã
ABRABE – Associação Brasileira de Bebidas
ANOVA - Analysis of Variance (Análise de Variância)
AR – Açúcares Redutores
AV – Acidez Volátil
CNP – Charmat não Pasteurizado
CP – Charmat Pasteurizado
CWoS – Cryoaromae sem Estabilizante
CWS – Cryoaromae com Estabilizante
EPAGRI – Empresa de pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder redutor/Antioxidante do Ferro)
FT - Fenóis Totais
GTM – Grupo de Trabalho sobre Maçã
INRA – Institut National de La Recherche Agronomique (Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica)
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
kgf – Kilograma-força
m – Metro
mg – Miligrama
MIP – Departamento de Microbiologia, Infectologia e Parasitologia
mL – Mililitro
mm – Milímetro
MM – Mosto de Maçã
MMN – Mosto de Maçã com Nutriente
N – Normal
nm – Nanômetro
NT – Nitrogênio Total
NTU – Nephelometric Turbidity Units (Unidades Nefelométricas de Turbidez)
ppm – Partes por milhão
TROLOX – Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFC – Unidades Formadoras de Colônia
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
µg – Micrograma
µL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 CULTURA DA MAÇÃ	25
3.2 REGIÕES PRODUTORAS EM SANTA CATARINA	25
3.3 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE MAÇÃS	25
3.4 MAÇÃ INDUSTRIAL.....	26
3.5 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	27
3.6 MERCADO DA SIDRA NO BRASIL	27
3.7 FATORES DE INFLUÊNCIA NAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DA SIDRA	28
3.7.1 <i>Microrganismo</i>	28
3.7.2 <i>Processo fermentativo</i>	28
3.8 BIOTECNOLOGIA.....	31
3.9 CONSTRUÇÃO DE FERMENTADOR	32
3.10 TECNOLOGIA DE ENCAPSULAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE SIDRAS.....	36
4 JUSTIFICATIVA	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1 MATERIAL.....	45
5.2 MÉTODOS.....	45
5.2.1 <i>Obtenção do suco de maçã fermentado pasteurizado (CP), não pasteurizado (CNP), com estabilizante (CWS) e sem estabilizante (CWoS)</i>	45
5.2.2 <i>Análises físico-químicas</i>	48
5.2.3 <i>Análise de compostos voláteis</i>	48
5.2.4 <i>Encapsulação de leveduras em alginato de cálcio</i>	51
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 SISTEMA DE FERMENTAÇÃO, FILTRAÇÃO E ENVASE.....	55
6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	59
6.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	60
6.4 ENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURAS EM ALGINATO DE CÁLCIO.....	67
7 CONCLUSÕES	75

8 REFERÊNCIAS77

1 INTRODUÇÃO

A maçã, originária da Europa, pertence a família das Rosáceas, é uma fruta nobre, apresentando maior concentração de plantio nas zonas subtropical e subpolar. Sua cultura é uma atividade relativamente recente no Brasil apresentando-se, porém, como componente da renda agrícola nos Estados do Sul, principalmente Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As principais regiões produtoras em Santa Catarina são Fraiburgo, no Meio-Oeste, e São Joaquim, no Planalto Serrano. A produção de maçãs no Brasil atingiu na safra 2011/12, aproximadamente 1,3 milhões de toneladas, sendo que Santa Catarina foi responsável por 46,3 % da produção.

No Brasil não há produção específica para a indústria de processamento. A fração que não pode ser aproveitada para consumo *in natura* está entre 20 % até 35 % da produção brasileira e cerca de 70 % dos frutos rejeitados para consumo *in natura* ainda são adequados para o processamento, recebendo a denominação de maçãs industriais. As frutas descartadas apresentam composição físico-química praticamente idêntica à das maçãs comercializadas. A maior parte das frutas tem como destino a produção de suco concentrado, uma parte menor, para sidra e desidratados.

Sidra é a bebida alcoólica, de 4 a 8 °GL, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou ambos, com ou sem a adição de água, podendo ser gaseificada artificialmente. Apresenta características de bebidas suaves, com baixo teor alcoólico, não apresenta aromas frutados e lembra aromas de produto fermentado sendo que o consumidor brasileiro tende a preferir uma sidra de tonalidade mais escura e doce, além de gaseificada. O mercado da Sidra brasileira gira em torno dos 10 milhões de litros anuais com uma participação de 3,5 % do mercado de bebidas.

A produção de bebidas fermentadas apresenta-se como um processo industrial influenciado por um complexo conjunto de fatores abióticos e fatores bióticos. Dentre os fatores bióticos, as leveduras são importantes pelo fato de serem os microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação que contribuem enormemente para as propriedades sensoriais dos produtos. A fermentação alcoólica é uma combinação de interações complexas envolvendo a variedade de mosto, microbiota e tecnologia de fermentação. Uma fermentação lenta e controlada é considerada como necessária à obtenção de uma sidra de qualidade. Nos produtos de fermentação rápida, a presença de aroma “de fermento” mascara ou substitui o aroma “frutado” considerado

como favorável à qualidade do produto. Baixas temperaturas (10-15 °C) podem ser usadas em fermentação alcoólica para aumentar a produção e retenção dos constituintes do aroma.

No projeto de biorreatores, integração de princípios biológicos e de engenharia torna-se essencial. O biorreator deve ser projetado de tal forma que as demandas biológicas e tecnológicas específicas sejam atingidas. O tipo de reator mais difundido é baseado no modelo de tanque cilíndrico vertical provido de sistema de aquecimento e resfriamento e demais controles necessários (pH, pressão, temperatura).

A implementação de sistemas com leveduras imobilizadas tem sido de especial interesse para a área de vinhos espumantes. A tecnologia de leveduras imobilizadas apresenta várias vantagens relacionadas a custo, possibilidade de controle da fermentação e redução do tempo de processo, além de menor necessidade de espaço para estocagem nas vinícolas.

A linha de pesquisa sobre fermentações do Laboratório de Bioprocessos teve seu início em 2010 e conta com 2 fermentadores projetados e construídos especificamente com essa finalidade dotados de sistema de filtração e envase isobárico, coleção de leveduras nativas isoladas no estado de Santa Catarina e processo para imobilização de leveduras.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Bioprocessos, em parceria com o Grupo de Trabalho sobre Maçã (GTM) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), com o objetivo de desenvolver tecnologia para a elaboração de sidras com perfil diferenciado dos produtos existentes no mercado nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver tecnologias para estudos da produção de sidras com perfil aromático característico a partir de suco concentrado de maçã.

2.2 Específicos

1. Projetar e construir dois fermentadores de 50 L de capacidade com sistema de controle de temperatura e pressão;
2. Desenvolver um sistema para filtração e engarrafamento isobárico em escala laboratorial;
3. Caracterizar os limites de utilização dos equipamentos desenvolvidos;
4. Produzir sidras a partir de suco de maçã concentrado;
5. Avaliar o perfil físico-químico e aromático do suco de maçã reconstituído;
6. Avaliar o perfil físico-químico e aromático de sidras elaboradas e conservadas por método térmico e químico;
7. Desenvolver, estabelecer metodologia e processo para produção de levedura encapsulada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultura da maçã

A maçã, fruta nobre originária da Europa, pertencente à família das Rosáceas, apresenta maior concentração de plantio nas zonas subtropical e subpolar.

O ciclo anual da maçã compreende duas fases distintas: repouso e crescimento vegetativo. Durante o período de repouso, característico da fisiologia da planta, ocorre produção de hormônios localizados nas gemas, que após a “quebra de dormência” promove o desenvolvimento de ramos vegetativos ou produtivos.

Como a produção é uma função do número de flores e do índice de área foliar, evidencia-se a importância do frio no processo de quebra da dormência e adota-se o número de horas em que a temperatura permanece abaixo de 7,2 °C (BRAGA *et al.*, 2001).

A cultura da maçã é uma atividade relativamente recente no país apresentando-se, porém, como importante componente da renda agrícola nos estados do Sul (BRAGA *et al.*, 2001), principalmente Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

3.2 Regiões produtoras em Santa Catarina

As principais regiões produtoras em Santa Catarina são Fraiburgo, no Meio-Oeste, e São Joaquim, no Planalto Serrano. Esta última a apenas aproximadamente 200 km da capital do estado. A distribuição da produção de acordo com os principais municípios produtores de maçã em Santa Catarina aponta o município de Fraiburgo como responsável por cerca de 39 % da produção de maçãs em Santa Catarina, o que caracteriza a região (apenas três municípios) como a maior produtora, com 53% da produção do estado. Na região de São Joaquim, encontra-se o segundo polo produtor, representando cerca de 34 % da produção estadual. Na primeira região, a produção de maçãs está geograficamente mais concentrada no município de Fraiburgo, na segunda, a produção é mais dispersa, envolvendo um número maior de municípios. Quanto às variedades utilizadas nos sistemas produtivos, na região de Fraiburgo a mais cultivada é a Gala, enquanto que em São Joaquim, predomina a Fuji (PEREIRA *et al.*, 2006).

3.3 Produção brasileira de maçãs

A produção de maçãs no Brasil atingiu na safra 2011/12, segundo dados do IBGE, aproximadamente 1,3 milhões de toneladas, com área colhida de 38 mil hectares e rendimento médio de 33 toneladas por

hectare. Nesta safra o estado de Santa Catarina teve uma queda de 12 % em sua produção, fazendo com que perdesse a liderança da produção nacional. Santa Catarina foi responsável por 46,3 % da produção, com 592 mil toneladas enquanto o Rio Grande do Sul responsável por 49,6 % da produção, com 634 mil toneladas.

3.4 Maçã industrial

No Brasil, ao contrário de países como França e Espanha, 100 % das maçãs são produzidas com objetivo de atingir o mercado *in natura* (ABPM, 2011; SILVA, 2004). Assim, não há produção específica para a indústria de processamento. O que vai para processamento é a fração da produção que não pode ser aproveitada para consumo *in natura*, ou seja, aquilo que por padrão de classificação (coloração, tamanho e formato adequados e boa aparência) não é possível ser aproveitado para o mercado de fruta fresca (ABPM, 2011).

A fração não aproveitada está entre 20 % até 35 % da produção brasileira, dependendo do ano, especialmente em função da extensão e época em que ocorrem as chuvas de granizo (ABPM, 2011). Cerca de 66 % dos frutos rejeitados como frutas para consumo *in natura* ainda são adequados para o processamento e recebem a denominação de maçãs industriais (SILVA, 2004). A maior parte dessa frutas vai para a produção de suco concentrado, uma parte menor vai para sidra e desidratados. No entanto, não há um levantamento em relação ao destino da fruta (ABPM, 2011).

A composição físico-química das frutas descartadas nas etapas de seleção e classificação e que apresentam deformidades, tamanhos impróprios, cicatrizes ou manchas, é praticamente a mesma das maçãs comercializadas e, dessa forma, essas frutas podem ser utilizadas pelas indústrias processadoras de suco. Em virtude disso, há possibilidade de valorizar economicamente essa fração da produção comercial até então sem muitas perspectivas (SILVA, 2004).

O tempo de estocagem e ambiente das maçãs anteriormente ao processamento em suco tem um impacto significativo no *flavor* do suco. A manutenção em câmaras de atmosfera controlada tem o objetivo de reduzir a respiração da fruta, retardando o amadurecimento e aumentando o tempo de estocagem. Entretanto, ambiente com redução da concentração de oxigênio altera a produção de compostos de *flavor* da fruta resultando em decréscimo no conteúdo de butil e hexil ésteres, aldeídos e cetonas e aumento de etanol, acetaldeído e etil ésteres (BOYLSTON, 2007). Suco de maçã concentrado pode ser utilizado como matéria-prima padrão por ser econômica, disponibilidade durante

o ano todo para sucos de frutas e por não sofrer alterações em sua composição e *flavor* ao longo do ano.

3.5 Legislação brasileira

Segundo a legislação brasileira, decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009, sidra é a bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou ambos, com ou sem a adição de água. A sidra poderá ser gaseificada, sendo proibida a denominação sidra-champanha, espumante ou expressão semelhante. A sidra poderá ser desalcooolizada por meio de processo tecnológico adequado e, nesse caso, deverá ser denominada de Sidra sem álcool, desde que o teor alcoólico seja menor ou igual a meio por cento em volume. A sidra pode ser adicionada de açúcares, somente para adoçamento, e de outros aditivos permitidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria Nº 64, de 23 de abril de 2008.

A acidez total, expressa em ácido málico, deverá possuir um valor mínimo de três gramas por litro e um valor máximo de oito gramas por litro. A acidez volátil, expressa em ácido acético, deverá possuir um valor máximo de um grama e meio por litro. O extrato seco reduzido deverá possuir um valor mínimo de quinze gramas por litro. O teor de cinzas não deverá ser inferior a um grama e meio por litro (BRASIL, 2008).

3.6 Mercado da Sidra no Brasil

As sidras produzidas no Brasil são gaseificadas pela incorporação de anidrido carbônico artificial ou naturalmente, pela manutenção de parte do gás carbônico formado naturalmente durante a fermentação alcoólica. Quando a gaseificação é feita durante a primeira fermentação do mosto, o método se denomina Asti, porém, quando é proveniente da refermentação, tanto pode ser conduzida num tanque pressurizado, pelo processo Charmat, quanto na própria garrafa de envase, pelo método Champenoise (CARVALHO, 2009).

O mercado da sidra brasileira gira em torno dos 10 milhões de litros anuais enquanto o mercado de vinhos e espumantes está em constante crescimento desde o início do novo milênio, com mercado de aproximadamente 300 milhões de litros e 4,5 milhões de litros, respectivamente. A sidra possui uma participação de 3,5 % do mercado de bebidas, excluindo-se a cerveja e a cachaça, enquanto vinhos e espumantes participam com 23,1 % desse mercado (ABRABE, 2011).

3.7 Fatores de influência nas características organolépticas da sidra

A aceitação e consolidação de bebida alcoólica fermentada estão diretamente relacionadas ao seu sabor. O sabor, por sua vez, é a resposta integrada ao gosto (doce, salgado, amargo, ácido) e ao aroma, dada pela presença de numerosos compostos voláteis. Em bebidas alcoólicas alguns desses compostos tem origem no próprio fruto enquanto outros, no decorrer do processo fermentativo e de reações químicas durante o envelhecimento (CARRUTI, 2001). Os compostos voláteis formados durante a fermentação, principalmente pelo metabolismo da levedura, afetam as características organolépticas da sidra (HERRERO *et al.*, 2006). Acetatos e ésteres etílicos, alcoóis superiores, ácidos graxos, cetonas e aldeídos formam a principal porção dos compostos aromáticos produzidos durante a fermentação (MALLOUCHOS *et al.*, 2003).

A produção industrial de bebidas fermentadas sofre influências de um complexo conjunto de fatores abióticos (pressão osmótica, pH, etanol, temperatura, etc.) e fatores bióticos (espécie de microrganismo, fatores *killer*, variedade de mosto, etc).

3.7.1 Microrganismo

Dentre os fatores bióticos, as leveduras são responsáveis pelo processo de fermentação, durante o qual produzem diversos metabólitos secundários (glicerol, acetato, succinato, piruvato, alcoóis superiores e ésteres) que contribuem para as propriedades sensoriais dos produtos (SALVADÓ *et al.*, 2011).

O uso de culturas iniciadoras selecionadas permite um maior controle do processo fermentativo permitindo uma produção uniforme, com alta qualidade mesmo em processos sucessivos e diferentes safras. A seleção de cepas ocorre em função de sua influência nas características organolépticas do produto final e em sua habilidade de conduzir a fermentação (DURIEUX *et al.*, 2005). No mercado há disponibilidade de uma variedade de culturas iniciais que grandes empresas produtoras de sidra ao redor do mundo utilizam. Entretanto, mesmo que o uso de culturas selecionadas seja unânime na indústria, os isolados utilizados, os equipamentos e as etapas de processo diferem entre produtores, resultando em produtos diferenciados.

3.7.2 Processo fermentativo

A fermentação alcoólica é uma combinação de interações complexas envolvendo a variedade de mosto, microbiota e tecnologia de fermentação. Alguns fatores afetam a fermentação alcoólica e, como consequência, a qualidade do produto. Os mais importantes são a

clarificação e composição do mosto, temperatura de fermentação, nível de dióxido de enxofre, a inoculação com leveduras selecionadas, a interação com microrganismos indígenas e suplementação com nutrientes (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2000; TORIJA *et al.*, 2003; CORTÉS *et al.*, 2010). Um desses fatores, a temperatura de fermentação, afeta diretamente a ecologia microbiana do mosto, as reações bioquímicas e o metabolismo das leveduras (TORIJA *et al.*, 2003; CORTÉS *et al.*, 2010) e, como resultado, a formação de metabólitos secundários como o glicerol, ácido acético, ácido succínico, determinando assim as qualidades químicas e organolépticas do fermentado (CORTÉS *et al.*, 2010). Fermentações a temperaturas abaixo de 15 °C levam a produtos mais aromáticos (LLARAUDÓ *et al.*, 2005; CORTÉS *et al.*, 2010).

De acordo com Llaraudó *et al.* (2002), fermentações a baixa temperatura são factíveis em mostos com conteúdo de açúcar menores que 200 g.L⁻¹, onde ocorre uma redução na velocidade de fermentação e, por consequência, maior tempo de fermentação. Uma fermentação lenta e controlada é considerada como necessária à obtenção de uma sidra de qualidade. Nos produtos de fermentação rápida, a presença de aroma “de fermento” mascara ou substitui o aroma “frutado” considerado como favorável à qualidade do produto. Esse aroma indesejável (de fermento) diminui na fase de maturação, mas se for desenvolvido na fermentação, permanecerá no produto final (NOGUEIRA e WOSIACKI, 2012).

As chamadas “fermentações frias”, em temperaturas de 6 a 10 °C, que são conduzidas por leveduras adaptadas ao frio, resultam em processos lentos e regulares sendo que os vinhos resultantes são secos, finos e aromáticos. Baixas temperaturas (10-15 °C) podem ser usadas em fermentação alcoólica para aumentar a produção e retenção dos constituintes do aroma (TORIJA *et al.*, 2003; SALVADÓ *et al.*, 2011).

Nos processos fermentativos ocorridos durante a gaseificação natural as leveduras se encontram em estado de estresse em razão da alta pressão, baixa temperatura e presença de álcool no meio. Assim, além do etanol e do gás carbônico, outros produtos como ácidos graxos e glicerol são metabolizados em baixas concentrações para atuarem como compostos de defesa da levedura, os quais, individual ou coletivamente, desempenham um papel nas características sensoriais do produto final (CARVALHO, 2009). Quantitativamente os componentes voláteis presentes na sidra são alcoóis superiores, ésteres, ácidos graxos de cadeia curta (HERRERO *et al.*, 2006; SATORA *et al.*, 2008) formados durante a fermentação e derivados da matéria-prima, bem como de

processos metabólicos das leveduras sob condição anaeróbia. A caracterização qualitativa e quantitativa de compostos aromáticos na sidra e sua produção durante a fermentação são desejadas para promover o controle de qualidade do produto (SATORA *et al.*, 2008).

Compostos fenólicos são o segundo grupo em importância dentre os constituintes da sidra devido a sua grande contribuição para suas propriedades sensoriais e outros atributos. Apresentam associação com amargor, adstringência, e estabilidade de cor, e alguns tem sido utilizados para detecção de adulterações em produtos a base de maçã e podem ser inibidores de crescimento microbiano, evitando perdas no processo. Do ponto de vista quantitativo, existem 5 grandes grupos de polifenóis encontrados em sidras: flavan-3-óis, procianidinas, flavonóis, diidrocalconas e ácidos hidroxicinâmicos e derivados (SATORA *et al.*, 2008).

Segundo Nogueira *et al.* (2003), a sidra brasileira apresenta características de bebidas suaves, com baixo teor alcoólico, não apresenta aromas frutados e lembra aromas de produto fermentado. Ainda segundo o mesmo estudo, o consumidor brasileiro tende a preferir uma sidra de tonalidade mais escura e doce, além de bem gaseificada.

A característica fundamental que distingue o processo de fermentação Asti dos demais é ele não ser derivado da segunda fermentação alcoólica de um fermentado base adicionado de sacarose, mas sim da fermentação alcoólica primária incompleta, interrompida por refrigeração quando a pressão do dióxido de carbono (CO₂) e a quantidade de açúcar residual do fermentado se apresenta nos limites desejados, podendo ser considerado um mosto semi-fermentado. Por este processo, desenvolvido por Giovan Batista Crose na região de Piemonte, Itália, os aromas frescos são mantidos intactos no produto naturalmente gaseificado (CARVALHO, 2009).

Espumante produzido pelo método champenoise é caracterizado pela segunda fermentação dentro da garrafa, a qual é adicionada açúcares, levedura e outros aditivos. As garrafas assim preparadas são estocadas horizontalmente em locais termorregulados onde a segunda fermentação ocorre. Uma vez que a fermentação tenha terminado e o produto esteja em contato com a levedura por pelo menos um ano, as garrafas são giradas frequentemente e inclinadas, para que a levedura deslize em direção ao gargalo da garrafa, onde sedimentam e são eliminadas pelo *dégorgement*. Esse processo, chamado *remuage*, é longo e árduo, pois requer grande trabalho por um longo período de tempo (1 a 4 meses) e por ocupar bastante espaço nas cavas (FUMI *et al.*, 1987).

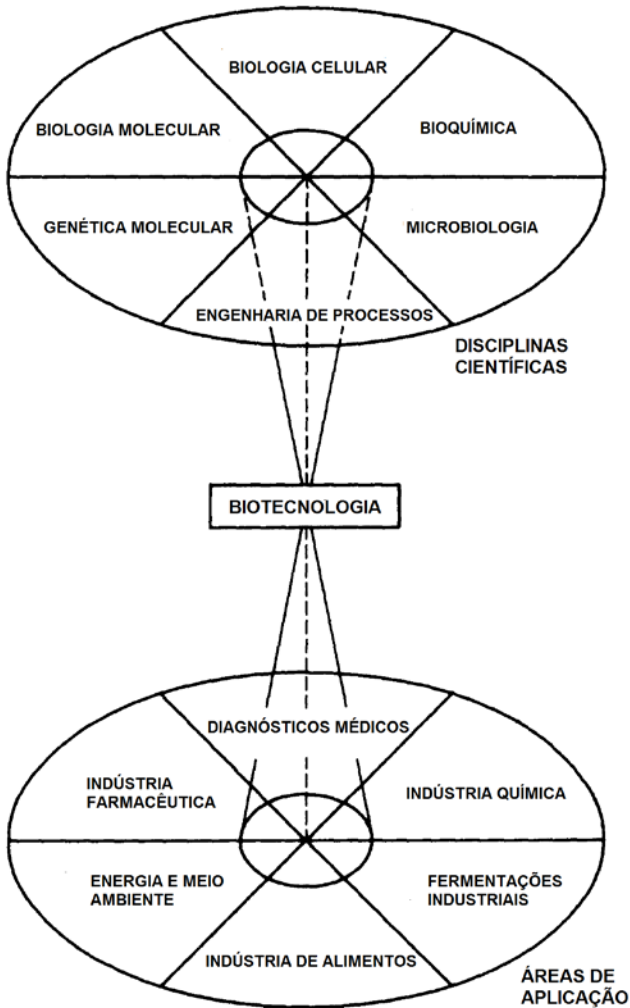
Após o término da fermentação, métodos de conservação e tempo de estocagem impactam e modificam o perfil. Dentre esses métodos, adição de dióxido de enxofre (SO₂), utilizado por empresas a fim de promover estabilidade microbiológica por prevenir a oxidação enzimática do produto e inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis pode também influenciar na saúde humana por sua concentração no organismo é cumulativo, o que pode levar a efeitos alérgicos como asma (GARDE-CERDÁN e ANCÍN-AZPILICUETA, 2007). Os mesmos pesquisadores encontraram que a concentração de SO₂ influenciou na evolução de alcoóis, ésteres e ácidos durante o envelhecimento de vinhos dentro da garrafa, apresentando aumento nesses compostos. Francis *et al.* (1994) reportaram que tratamento térmico de vinhos a 90 °C por aproximadamente 2 minutos produziu vinhos que não eram significativamente diferentes dos tratamentos controle. Esse resultado pode indicar o uso do tratamento térmico como uma alternativa na preservação de bebidas fermentadas.

3.8 Biotecnologia

Segundo Riet e Tramper (1991), biotecnologia não é apenas a soma de microbiologia, genética, bioquímica, engenharia, é a integração dessas disciplinas (Figura 1), e isso envolve um pouco mais que simples adição. Integração e aplicação são as palavras-chave que podem ser encontradas em grande parte das definições de biotecnologia. Especialmente no projeto de biorreatores, integração de princípios biológicos e de engenharia é essencial. O biorreator deve ser projetado de tal forma que as demandas biológicas e tecnológicas específicas são atingidas.

Segundo a definição do Livro de Ouro do Compêndio de Química Tecnológica, IUPAC (2012), define-se biorreator como um aparato utilizado para realizar qualquer tipo de bioprocessos; os exemplos incluem fermentador ou reator enzimático, enquanto fermentador é um biorreator que permite que as condições ótimas para a fermentação sejam mantidas, permitindo adição de nutrientes, remoção de produtos e a inserção de sondas de mensuração e/ou controle bem como qualquer outro equipamento necessário (por exemplo: aquecimento, resfriamento, aeração, agitação, esterilização) sob condições estéreis. Pela mesma fonte, define-se fermentação, em termos de microbiologia, como o processo no qual ocorre o cultivo de células (microrganismos, células de plantas ou animais) em biorreator em meio líquido ou sólido para converter substâncias orgânicas em biomassa (crescimento) ou em produtos.

Figura 1 Biotecnologia: integração entre biodisciplinas e engenharia. Fonte: RIET e TRAMPER, 1991.



3.9 Construção de fermentador

As fermentações descontínuas clássicas, ou simplesmente, fermentações descontínuas, conhecidas por fermentações por batelada, vem sendo utilizadas pelo homem desde a Antiguidade e, ainda são as

mais empregadas para a obtenção de vários produtos fermentados (CARVALHO e SATO, 2007).

Seu modo de operação pode ser descrito da seguinte forma: no instante inicial a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microrganismos e incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos, antiespumante, e ácido ou base para controle do pH. Terminada a fermentação, descarrega-se a dorna, e o meio fermentado segue para os tratamentos finais. Então, deve-se lavar a dorna, esterilizá-la e recarregá-la com mosto e inóculo. Conclui-se, pela descrição, que se não houver adição de soluções para controle do processo, nem perda de líquido por evaporação, o volume no decorrer da fermentação permanece constante, o que pode ser considerado mais uma das características do processo descontínuo de fermentação (CARVALHO e SATO, 2007).

A fermentação descontínua apresenta menores riscos de contaminação (se comparados com processos contínuos de fermentação), grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto. Ademais, é o mais utilizado na indústria de alimentos. Alguns dos alimentos e bebidas produzidos por esse processo fermentativo são iogurte, chucrute, picles, cerveja, vinho (CARVALHO e SATO, 2007).

O desenvolvimento dos equipamentos de fermentação foi lento e em grande parte empírico. Os primeiros produtos obtidos por fermentação, como por exemplo, a produção de vinho, cerveja, queijos, iogurte, vinagre, chucrute se processavam satisfatoriamente, mesmo sob condições precárias de assepsia. A natureza específica do substrato empregado, o crescimento vigoroso do microrganismo utilizado, ou ainda a ação inibidora do produto final, contribuíram, separadamente ou em conjunto, para o bom andamento dos processos fermentativos. A passagem desses processos artesanais de fermentação a escalas comerciais mais evoluídas aportou poucos melhoramentos ao desenvolvimento dos equipamentos utilizados (THIEMANN, 2007).

Segundo Thiemann (2007), um primeiro passo no melhoramento e na maior sofisticação dos processos fermentativos ocorreu com a introdução de culturas puras na produção de cerveja. Contudo, foi

apenas durante os anos de 1914-1918 que o conceito e condições de fermentação controlada se afirmaram, sendo o marco inicial da fermentação industrial sob condição de total assepsia.

Para satisfazer a função primária de um reator de fermentação, que é a de fornecer condições ambientais adequadas ao crescimento dos microrganismos, uma série de parâmetros deve ser considerada e incorporada ao mesmo, durante sua fase de projeto e construção (THIEMANN, 2007).

Um grande número de diferentes concepções de reatores têm sido descritos na literatura, contudo somente algumas têm se mostrado satisfatórias e encontraram aplicação industrial. O tipo de reator mais difundido, baseado no modelo de tanque cilíndrico vertical, agitado mecanicamente ou não, provido de sistema de aquecimento e resfriamento e demais controles necessários ao processo (THIEMANN, 2007).

Segundo Thiemann (2007), para a elaboração de um projeto de fermentador, diversas etapas devem ser cumpridas. A etapa primária representa a coleta de todos os dados relativos ao projeto, englobando dados referentes ao processo biológico a ser desenvolvido, como a planta a ser construída. Dados do processo englobam informações sobre a cinética do processo, balanços térmicos das reações, condições de assepsia necessárias, propriedades fisiológicas do(s) microrganismo(s), necessidade de matérias-primas e suas características. A etapa seguinte é a elaboração de um fluxograma detalhado do processo, baseado nos dados acumulados e estabelecido na primeira etapa. Com os dados e informações disponíveis através dos levantamentos das duas etapas anteriores, o desenho mecânico vai detalhar as especificações de todo o projeto.

A escolha dos materiais de construção dos equipamentos de fermentação é de vital importância, e deve ser feita levando em consideração as condições particulares às quais os metais serão expostos. Ao contrário das condições encontradas na indústria química, nas indústrias de fermentação as variações de temperatura e pressão utilizadas são limitadas e o pH é mantido geralmente próximo ao neutro. Contudo, ao contrário da indústria química, as exigências de operações assépticas são fundamentais e condicionam profundamente a escolha dos materiais de construção. Para reatores de volume limitado (1-20 L) (reatores de bancada) é perfeitamente possível o emprego de vidro. A utilização de vidro apresenta uma série de vantagens: superfícies lisas, facilidade de limpeza, não tóxico, resistente à corrosão e facilidade de inspeção visual. Reatores pilotos e industriais, onde os volumes podem

variar de 50 L a 500 m³ ou mais, são construídos em aço inoxidável. Na construção desses reatores os materiais utilizados devem ser avaliados em função de sua capacidade de resistir às pressões de esterilização, resistência à corrosão, toxicidade dos produtos resultantes de uma eventual corrosão e custo do material (THIEMANN, 2007).

Os vários processos fermentativos foram desenvolvidos tendo em vista mais a prevenção da contaminação dos processos pelo meio ambiente do que vice-versa. Para garantir a manutenção da esterilidade e das condições de contenção ambiental, atenção especial deve ser dada à construção e ao tipo de material de vedação empregado na junção entre as diversas partes, que pode ser entre vidro/vidro, vidro/metalo metal/metalo. As especificações do material utilizado nas juntas de vedação são importantes, pois os selos estáticos (guarnições) formam frequentemente a única barreira de que se dispõe para evitar a perda do produto em processamento e, por consequência, a quebra das condições de contenção ambiental. Para vedações metal com metal, a utilização de anéis de vedação (*O-ring*) é sempre a mais indicada, podendo estes ser simples ou duplos, e neste caso ainda providos de um selo interno de vapor (THIEMANN, 2007).

A espessura do material de construção do corpo do reator varia de acordo com o seu dimensionamento. Para reatores de 30-40 m³ de capacidade, normalmente chapas de 7 mm de espessura são utilizadas para o corpo cilíndrico e de 10 mm para as calotas hemisféricas superior e inferior (THIEMANN, 2007).

Nas temperaturas elevadas que ocorrem nos pontos de solda, o cromo presente no aço inoxidável combina com o carbono formando precipitados, reduzindo assim a resistência à corrosão nestes pontos. O problema pode ser evitado, utilizando aço inoxidável estabilizado pela adição de titânio, que se combina preferencialmente com o carbono. O emprego do argônio nas soldas impede uma oxidação excessiva nestes pontos e garante a integridade das soldas, reduzindo o perigo de corrosão (THIEMANN, 2007).

Tanto as camisas como as serpentinas, que podem ser internas como externas, neste caso sob a forma de semitubos, têm a finalidade de fornecer calor durante a esterilização como retirar calor durante a fase de resfriamento e manutenção da temperatura de fermentação. As camisas são cada vez menos utilizadas na construção de reatores, pela sua reduzida eficiência na transferência de calor pela circulação irregular do vapor ou da água de refrigeração nas mesmas. A eficiência das trocas térmicas, tanto para esterilização como refrigeração, pode ser

umentada significativamente, equipando chicanas com circulação interna de vapor e/ou solução refrigerante (THIEMANN, 2007).

Difusores de ar em fermentadores sem agitação mecânica têm sido empregados em alguns casos na produção de levedura, e mais largamente em fermentadores *airlift* (THIEMANN, 2007).

Para que um processo fermentativo possa operar sob as condições de assepsia e segurança biológica exigida, não basta que a atenção seja dirigida exclusivamente ao projeto de construção do reator e seu sistema de aeração e agitação. Um processo fermentativo, para ser completo, necessita uma série de equipamentos adicionais tanto a montante como a jusante, tais como: válvulas, linhas de transferência de inóculo, nutrientes, antiespuma, amostragem, sondas diversas, que devem ser projetados e construídos de tal modo que ofereçam as condições de segurança e esterilidade necessárias ao processo e aos operadores. O projeto construtivo do fermentador deve ser tal que permita a esterilização do mesmo por admissão direta de vapor, sob pressão por um tempo suficientemente longo. A esterilização pode ser feita juntamente com o meio, ou este pode ser esterilizado em separado por filtração e adicionado asepticamente ao fermentador esterilizado vazio, com vapor (THIEMANN, 2007).

3.10 Tecnologia de encapsulação para produção de sidras

O uso da imobilização de microrganismos vem crescendo ao longo dos anos, pois apresenta várias vantagens quando comparada com cultura em suspensão, incluindo maior velocidade de crescimento e maior biomassa em biorreatores, maior taxa de diluição sem ocorrência de lavagem (wash-out) em processos contínuos e mais fácil coleta e purificação de produtos. Apresenta melhor estabilidade de biocatalisadores bem como tolerância a altas concentrações de compostos tóxicos (WEN-TAO *et al.*, 2005). Dentre os métodos de imobilização, a encapsulação é o processo de confinamento de compostos ativos dentro de uma matriz na forma particulada para atingir efeitos desejados, como imobilização ou isolamento, proteção ou estabilização, liberação controlada, alteração de propriedades físicas (CHAN *et al.*, 2011).

O conceito de encapsulação é fundamentado na incorporação de uma matriz polimérica, a qual forma um ambiente capaz de controlar sua interação com o exterior. A técnica de microencapsulação é descrita como um processo no qual pequenas partículas ou gotas são rodeadas por um recobrimento homogêneo ou heterogêneo integrado às cápsulas com variadas aplicações. As microcápsulas podem ter forma esférica ou

irregular, podem ser constituídas por uma membrana simples, múltiplas membranas ou múltiplos núcleos cuja matriz pode ser do mesmo material ou uma combinação de vários (PASIN *et al.*, 2012).

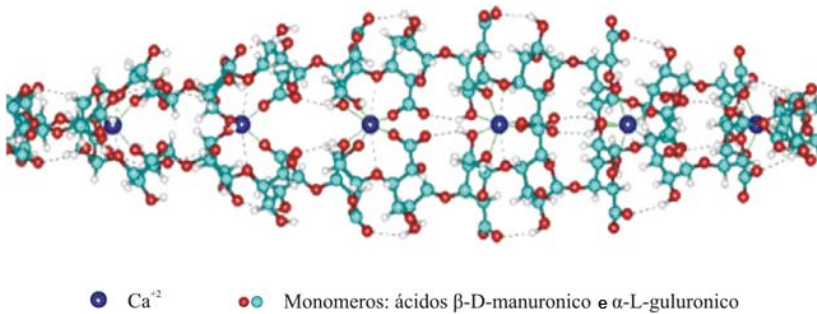
As matrizes mais adequadas são polímeros naturais como o alginato, a carragena e o ágar, que polimerizam sob condições mais suaves e cumprem requisitos como ser de grau alimentício (conforme o caso), baixo custo, disponibilidade, não degradáveis e aptos para condições de pH e temperaturas baixas (FAJARDO-OCHOA *et al.*, 2011), além de miscibilidade da suspensão celular com a solução polimérica. A formação do gel deve ocorrer sob condições brandas sem o uso de produtos químicos tóxicos, a fim de manter a viabilidade das células. O gel deve possuir boa estabilidade mecânica sob as condições de operação, o tamanho do poro da matriz de gel deve ser suficientemente grande para permitir a difusão de substratos e produtos, mas deve ser pequeno o suficiente para reter as células dentro da matriz. Finalmente, o custo total do procedimento de encapsulação deve ser baixo (MARGARITIS e KILONZO, 2005). Os hidrocolóides tem sido empregados como matriz devido a sua capacidade para reter água, fácil manipulação e inocuidade. O alginato é um hidrocolóide que possui tanto essas características como propriedades geleificantes, estabilizantes e espessantes (PASIN *et al.*, 2012).

O alginato é descrito como um polissacarídeo linear poliônico e hidrofílico proveniente de algas marinhas composto por dois monômeros em sua estrutura, ácido α -L-gulurônico (G) e o ácido β -D-manurônico (M) que se distribuem em seções, constituindo homopolímeros tipo blocos G (-GGG-), blocos M (-MMM-) ou heteropolímeros onde os blocos M e G se alternam (-MGMG-). Tanto a distribuição de seus monômeros na cadeia polimérica como a carga e volume dos grupos carboxílicos conferem ao gel formado características de flexibilidade ou rigidez dependendo do conteúdo em G. Se em sua estrutura polimérica se tem maior quantidade de blocos G, geralmente o gel é forte e frágil, enquanto que com a presença majoritária de blocos M o gel formado se apresenta fraco e elástico. O processo de geleificação ocorre em presença de cátions multivalentes (exceto o magnésio), onde o íon cálcio é o mais utilizado pela indústria de alimentos. A geleificação ocorre ao produzir uma zona de união entre um bloco G de uma molécula de alginato que se liga a outro bloco G de outra molécula de alginato através do íon de cálcio, como pode ser observado na figura 2. Entre os sais de alginato mais empregados está o sal de sódio devido a sua alta solubilidade em água fria e característica de transição solução-gel de forma instantânea e irreversível ante o íon

cálcio. Ao contrário da maioria dos polissacarídeos, o alginato forma gel praticamente independente da temperatura. Além disso, a condição de polieletrólito confere a capacidade de interagir com outras moléculas permitindo formar sistemas mistos que demonstram melhoras nas propriedades estruturais do gel de alginato (PASIN *et al.*, 2012).

O processo de formação do gel se inicia a partir de uma solução de sal de alginato e uma fonte de cálcio externa ou interna de onde o cálcio se difunde até alcançar a cadeia polimérica, como consequência desta união se produz um reordenamento estrutural resultando em um material sólido com as características de um gel. O grau de geleificação depende da hidratação do alginato, da concentração de íon cálcio e a quantidade de blocos G (PASIN *et al.*, 2012).

Figura 2 Reação entre o alginato e íons cálcio. Fonte: PASIN *et al.*, 2012



Os mecanismos de geleificação iônica se dão fundamentalmente por dois processos: a geleificação externa e a geleificação interna. O processo de geleificação externa ocorre com a difusão do íon de cálcio desde uma fonte que envolve o hidrocólóide numa solução de alginato. A formação do gel se inicia na interface e avança para o interior a medida que a superfície se encontra saturada de íons cálcio, de maneira que o íon sódio proveniente do sal de alginato é substituído pelo cátion divalente solubilizado em água. Este, por sua vez, interage com os blocos G de diferentes moléculas de polímero, enlaçando entre si. A fonte de cálcio mais utilizada é o cloreto de cálcio (CaCl₂) devido à sua maior porcentagem de cálcio disponível. O processo de geleificação interna consiste na liberação controlada do íon cálcio de uma fonte interna de sal de cálcio insolúvel ou parcialmente solúvel dispersa na solução de alginato de sódio. A liberação de íon de cálcio pode ocorrer por solubilização ácida ou por adição de agente sequestrante, no caso de sal de cálcio parcialmente solúvel. A principal diferença entre o

mecanismo de geleificação externa e interna é a cinética do processo. Se o que se pretende é o controle da transição solução-gel, no processo de geleificação externa os fatores a manipular são a concentração de cálcio e composição do polímero. Enquanto que, para o processo de geleificação interna deve-se considerar a solubilidade e concentração do sal de cálcio, concentração do agente sequestrante e de ácido empregado (PASIN *et al.*, 2012).

Hidrogéis de alginato têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos como espessante e agente geleificante. A capacidade do alginato de reter água tem encontrado várias aplicações na indústria biomédica (QIN, 2008). Como agente encapsulante, o alginato de cálcio tem sido utilizado para imobilizar células animais, células microbianas, mitocôndrias, cloroplastos, protoplastos, hemoglobina (PARK e CHANG, 2000).

A microencapsulação de pequenas moléculas, células e microrganismos pode se dar por diferentes técnicas. A seleção da técnica de encapsulação adequada é determinada pelas propriedades físico-químicas do material suporte e a aplicação final desejada com o objetivo de assegurar a biodisponibilidade dos compostos, sua funcionalidade e também sua fácil utilização em alimentos sem a alteração de suas propriedades sensoriais. Ao empregar o alginato como matriz polimérica, dentre as técnicas de microencapsulação está a extrusão.

A técnica de extrusão consiste na formação de gotas da solução de alginato que contém o componente a encapsular ao passar a solução por um dispositivo extrusor de tamanho e velocidade de gotejamento controlado. Estas gotas caem sobre um banho que contém a fonte de íon divalente, que induz a geleificação pelo mecanismo de geleificação externa. A principal limitação desta técnica é o grande tamanho das microcápsulas, o qual depende do diâmetro da saída do dispositivo extrusor. Entre outras desvantagens, a dificuldade de produção em grande escala devido ao fato que a formação das microcápsulas ocorre uma a uma, o que traz como consequência longos tempos de geleificação. Além disso, devem-se considerar aspectos que influenciam sua forma esférica e tamanho, como a distância que separa a saída com o banho, o efeito da gravidade e da tensão superficial da solução que induz a geleificação. Apesar de todos esses fatores, esta técnica de microencapsulação tem sido tradicionalmente utilizada por permitir a produção de microcápsulas com tamanhos uniformes (PASIN *et al.*, 2012).

Apesar de o alginato ser adequado para a encapsulação, o gel apresenta sensibilidade a pH extremos e matrizes porosas que condicionam tanto a liberação como a proteção dos compostos. Esta característica pode ser compensada ao modificar a estrutura do gel, ao usar sistemas poliméricos mistos para a formação da matriz ou com o revestimento das micropartículas. Segundo os autores, estudos mostraram melhora nas propriedades físico-químicas do alginato ao preparar matrizes mistas com quitosana e poli-lisina aplicando diferentes técnicas de encapsulação (PASIN *et al.*, 2012).

A metodologia clássica e mais popular de produção de cápsulas de alginato de cálcio mono-dispersas e esféricas é pelo uso da técnica de gotejamento (extrusão). Embora esse método seja usado por vários anos, formação de cápsulas com tamanho desejado e formato esférico geralmente requer testes da formulação e planejamento experimental. Se as condições não são ótimas, cápsulas deformadas ou com prolongamento podem ser produzidas (CHAN *et al.*, 2009).

A implementação de sistemas com leveduras imobilizadas tem sido de especial interesse para a área de vinhos espumantes (FAJARDO-OCHOA *et al.*, 2011). A tecnologia de leveduras imobilizadas comparada com o tradicional método Champenoise, apresenta várias vantagens relacionadas a custo, possibilidade de controle da fermentação e redução do tempo de processo como resultado da eliminação das etapas de *remuage* e *dégorgement* e menor necessidade de espaço para estocagem nas vinícolas (FUMI *et al.*, 1988; TATARIDIS *et al.*, 2005), reduzindo os custos de produção em 80 % se comparado com o método tradicional sem alteração das características físico-químicas ou organolépticas do produto (FUMI *et al.*, 1988). Devido a mudanças na composição das células por interação com o suporte de alginato, tornam-se mais ativas e observa-se que a fermentação ocorre a uma maior velocidade se comparada com os casos onde se é utilizada a levedura livre. Outra vantagem importante de sistemas imobilizados é que o suporte protege a levedura da ação de inibidores, metais pesados, fenóis e temperaturas extremas. Além disso, diferentemente dos flocos de biomassa, estes sólidos são de manejo mais simples, permitindo um melhor controle da atividade catalítica em reatores do tipo batelada e contínuo (FAJARDO-OCHOA *et al.*, 2011). Ela também facilita a fermentação sob pressão de CO₂ pelas leveduras estarem parcialmente protegidas da toxicidade do etanol. O fator crítico do uso de leveduras imobilizadas na produção de espumantes é a liberação de células das esferas de gel dentro da garrafa, que deixa o

vinho com células livres, negando suas vantagens (TATARIDIS *et al.*, 2005).

Microencapsulação em cápsulas de alginato de cálcio tem a vantagem de ser um processo bastante brando e por manter a atividade de moléculas biológicas ou mesmo células. Entretanto, cápsulas de alginato de cálcio são bastante porosas e apresentam baixa capacidade de retenção das moléculas encapsuladas. Para limitar a perda de material encapsulado, as microcápsulas são, às vezes, cobertas com polímeros policatiônicos que formam uma membrana na superfície da cápsula (HUGUET e DELLACHERIE, 1996). Dentre os materiais utilizados para a elaboração da membrana externa estão o alginato de cálcio (GÒDIA *et al.*, 1991; YAMAGIWA *et al.*, 1992; TARTARIDIS *et al.*, 2005) e a quitosana (HUGUET *et al.*, 1995; HUGUET e DELLACHERIE, 1996; GÅSERØD *et al.*, 1998; WEN-TAO *et al.*, 2005).

Durante a utilização de células ou enzimas imobilizadas, geralmente ocorre o problema de saída do biocatalizador do suporte para o meio. No caso das esferas de géis de alginato de cálcio preparadas pelo método convencional de imobilização, as células aderidas na superfície das esferas ou próximas dessa, podem facilmente sair das esferas e crescer rapidamente no meio de cultura, podendo interferir na cinética do catalisador imobilizado. Além disso, a fácil separação do biocatalizador do meio, que é considerado um dos importantes méritos da imobilização, não é totalmente alcançado devido ao escape das células (YAMAGIWA *et al.*, 1992). A taxa de escape de células da matriz polimérica é dependente das propriedades físicas da matriz como a resistência mecânica e tamanho de poro, bem como do tipo de célula, concentração inicial e condições de cultivo (TANAKA *et al.*, 1989).

A proliferação celular dentro da cápsula quebra parcialmente a superfície da mesma e células são liberadas para o meio de cultivo. Quando uma segunda camada é utilizada, o crescimento celular ainda pode ocorrer, pois as células liberadas ficam retidas na camada externa (GÒDIA *et al.*, 1991). Segundo esses autores, o método de produção de cápsulas de alginato de cálcio com uma segunda camada do mesmo material, além de reduzir o número de cápsulas necessárias à segunda fermentação, ainda pode reduzir efeitos decorrentes de acidentes que possam reduzir a concentração celular ou viabilidade celular durante o preparo das cápsulas. A razão é que a camada externa impõe uma barreira física à liberação de células. Apenas um crescimento celular anormal pode ultrapassar a capacidade das cápsulas com camada externa

e ocorrer a liberação de células no meio. A mesma segurança não se consegue em cápsulas sem o revestimento.

Cápsulas de alginato-quitosana podem ser produzidas por diferentes métodos. Um deles é um procedimento de dois estágios no qual cápsulas de alginato de cálcio são produzidas por gotejamento de uma solução de alginato em um banho contendo íons de cálcio. As cápsulas são então transferidas para uma solução de quitosana para formar uma membrana na superfície das cápsulas (GÅSERØD *et al.*, 1998). Cápsulas produzidas a partir de alginato com maior porção de blocos G se ligam mais rapidamente à quitosana que àquelas com maior porção de blocos M, porém formam géis com maior coeficiente de difusão, indicando a presença de poros com diâmetros maiores. O uso de íons de sódio não geleificantes tem efeito positivo na ligação com a quitosana, porém eles só podem ser utilizados com restrição. Sódio não pode substituir totalmente íons de cálcio pois eles competem por posição nos grupos carboxílicos, levando a géis mais fracos (GÅSERØD *et al.*, 1998).

4 JUSTIFICATIVA

Considerando a quantidade de matéria-prima disponível no Estado de Santa Catarina, sua fácil e barata aquisição, por agregar valor às maçãs industriais e, principalmente, pela falta de uma cultura de produção sidras com qualidade, a proposta do presente trabalho é o de iniciar e estabelecer uma linha de pesquisa na UFSC com o objetivo de desenvolver processos e equipamentos direcionados à processos fermentativos que pequenos e médios empresários possam utilizar, além de elaborar e caracterizar sidras produzidas a partir de suco concentrado de maçã.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

Duas cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas como inóculo de levedura fermentativa: Fermol® Cryoaromae (var. *uvarum*) e Fermol® Charmat (var. *bayanus*) (AEB BIOQUÍMICA LATINO AMERICANA), ambas fornecidas na forma seca ativa.

Para os ensaios de encapsulação foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com fator *killer* Perlage BB (AEB Group), fornecida na forma seca ativa.

Suco de maçã concentrado (Gala:Fuji 70:30, BRIX >70,1°, com acidez de 1,0 a 2,0 g % ácido málico, cor 440 > 50,0 % e turbidez < 3,0 NTU) (FISCHER S.A) foi utilizado para a realização dos experimentos.

Alginato de sódio de alta viscosidade (Próquimios), cloreto de cálcio (NUCLEAR), cloreto de sódio (VETEC) e quitosana comercial (grau de desacetilação 85,9 %, Polymar) foram utilizados nos ensaios de produção das cápsulas.

5.2 Métodos

5.2.1 Obtenção do suco de maçã fermentado pasteurizado (CP), não pasteurizado (CNP), com estabilizante (CWS) e sem estabilizante (CWoS)

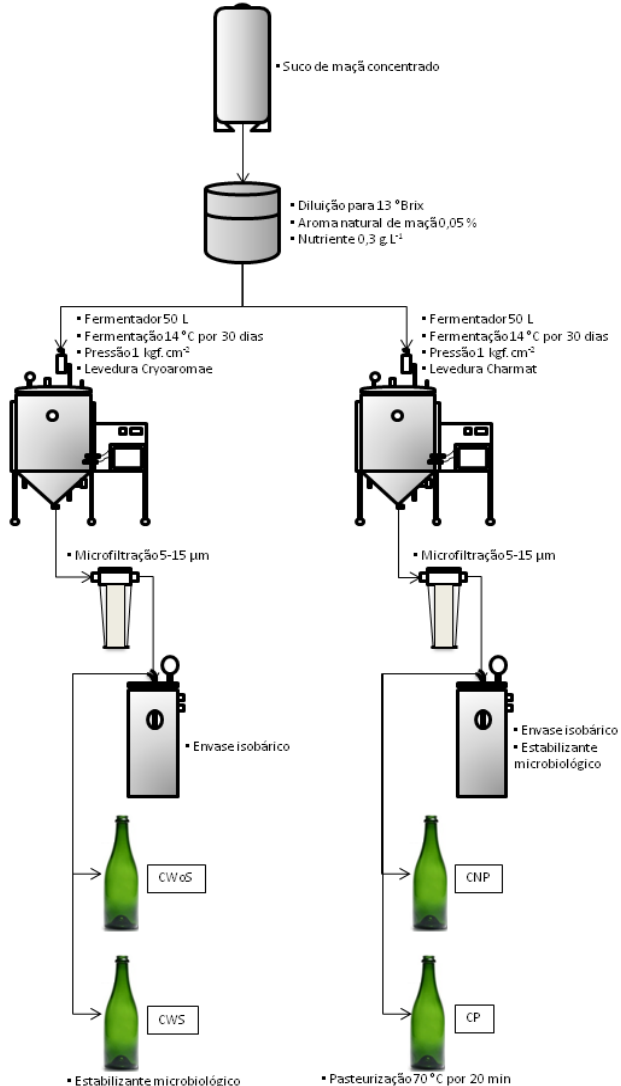
Suco de maçã reconstituído a 13 °BRIX (MM) suplementado com nutriente para vinificação Fermoplus® Blanc, fornecida pela AEB BIOQUÍMICA LATINO AMERICANA, na dose recomendada pelo fabricante de 0,3 g.L⁻¹ e adicionado de aroma de maçã (Álcool < 10,0 °GL, aldeídos totais > 700 ppm, trans-2-hexenal > 200 ppm) (FISCHER S.A) na concentração de 0,05 % foi utilizado como mosto de maçã (MMN).

Para os ensaios de fermentação foi desenvolvido sistema de fermentação composto de fermentador com capacidade para 50 L de volume útil dotado de sensor de temperatura (pt100) juntamente com controlador de temperatura N480D (Novus Ltda.), medição, controle e transmissão de pressão através de sensor NP430D (Novus Ltda.), manômetro analógico e válvula de controle de pressão e controle de dados através de *datalogger* (MyPCLab, Novus Ltda.)

As amostras de sidra foram obtidas a partir da fermentação do mosto de maçã reconstituído. O mosto foi inoculado com leveduras Fermol® Cryoaromae ou com leveduras Fermol® Charmat, reidratadas e dosadas de acordo com a recomendação do fabricante de 0,2 g.L⁻¹, gerando uma população inicial de aproximadamente 2.10⁶ UFC.mL⁻¹. As fermentações foram conduzidas em fermentadores de 50 L pelo

método Asti, sob pressão constante de 1 kgf.cm^{-2} a partir da produção de gás carbônico pelas leveduras durante 30 dias a $14 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme encontrado por Llaraudó *et al.* (2002) para fermentações de vinhos brancos a temperaturas similares. Após decorrido o tempo, a fermentação foi parada por abaixamento da temperatura até $3 \text{ }^\circ\text{C}$ e o produto foi filtrado em elemento filtrante com porosidade média de 5-15 μm e envasadas em câmara isobárica com capacidade para uma garrafa de 750 mL, equipada com entrada/saída de gás para aumento da pressão da câmara próxima da pressão do fermentador, manômetro, visor em policarbonato e iluminação para acompanhamento do processo de enchimento. Em alguns tratamentos foi adicionado estabilizante microbiológico (Microcid, AEB LATINO AMERICANA), na dosagem recomendada de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, em outro, elas foram também pasteurizadas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 Fluxograma de desenvolvimento das bebidas fermentadas. CWoS – produzido em fermentador de 50 L sem adição de estabilizante microbiológico; CWS – produzido em fermentador de 50 L com adição de estabilizante microbiológico; CNP – produzido em fermentador de 50 L com adição de estabilizante microbiológico; CP – produzido em fermentador de 50 L com adição de estabilizante microbiológico e submetido à pasteurização a 70 °C/20 min.



5.2.2 Análises físico-químicas

As análises seguintes foram realizadas no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus de Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná.

O teor de açúcares redutores (AR) foi determinado pelo método clássico de Somogyi-Nelson, conforme descrito por Tanner e Brunner (1985), com leitura da absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu UVmini-1240) a 520 nm. A acidez total (AT) foi determinada por titulação das amostras com hidróxido de sódio de normalidade conhecida (NaOH 0,1 N) e indicador fenolftaleína 1 % até viragem de cor. O resultado é apresentado em equivalente-grama de ácido málico. 100 mL^{-1} (IAL, 2008). A acidez volátil (AV) foi analisada pelo arraste de vapor e titulação com NaOH de normalidade conhecida (0,05 N) na presença de fenolftaleína 1 % como indicador, usando-se no cálculo o fator do ácido acético (CHAVARRIA *et al.*, 2008). O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl em destilador de nitrogênio (Marconi MA036-plus). A graduação alcoólica foi determinada por ebuliometria. A quantificação de fenóis totais (FT) foi determinada por análise colorimétrica de Folin-Ciocalteau (Cromato F2002920500) descrita por Singleton e Rossi (1965). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 720 nm, com resultado expresso em mg.L^{-1} , utilizando catequina (SIGMA, C-1251) como padrão ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A atividade antioxidante (AA) foi determinada pelo método descrito por Benzie e Strain (1996) e Pulido *et al.* (2000), utilizando reagente redução de ferro/poder antioxidante (FRAP) como branco (L1). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 593 nm, monitorada durante 6 minutos (L6). Para determinação da atividade antioxidante, foi calculada a variação de absorbância entre L6 e L1 calculada para cada amostra, sendo traduzida em um valor de FRAP por proporcionalidade com uma solução de ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) de concentração conhecida, $1000 \mu\text{M}$, medida em paralelo. O resultado foi expresso em μmol de redução de ferro. mL de amostra $^{-1}$.

Os dados das características físico-químicas dos fermentados foram submetidos à análise estatística de ANOVA ($p < 0,05$), seguida de teste de Tukey para a detecção de diferença significativa entre as amostras em software Excel® 2007.

5.2.3 Análise de compostos voláteis

A análise de compostos voláteis foi realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Ponta Grossa, Paraná.

O perfil de voláteis foi determinado através da técnica de extração por *headspace*, conforme descrito por Pietrowski *et al.* (2012). Em frasco vial foram adicionados 6 mL do suco reconstituído ou fermentado, e após agitação a 60 °C por 10 minutos em um autoamostrador de *headspace* (hta HT280T) os voláteis foram coletados utilizando seringa para cromatografia gasosa (SERINGA MICROLITER DE 1500 µL – HAMILTON). Para identificação e quantificação dos compostos voláteis de sucos e fermentados de maçã foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Young Lin Instrument – YL 6100 GC), equipado com detector de ionização de chama - FID, coluna capilar (Phenomenex) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 25 mm e filme de ZB-WAX com 0,25 µm de espessura. A temperatura de operação do injetor foi de 220 °C, do detector, 230 °C, o gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 2,5 mL.min⁻¹ e a técnica de injeção foi split 1:1,2. As condições de análise foram: programação de isoterma de 40 °C por 5 minutos, elevação de 10 °C.min⁻¹ até 150 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. A seguir uma elevação de 10 °C.min⁻¹ até 200 °C, permanecendo por 5 minutos e nova elevação de 10 °C.min⁻¹ até 220 °C, onde permaneceu por 10 minutos.

Os compostos foram identificados segundo metodologia descrita por Pietrowski *et al.* (2012), comparando-se o tempo de retenção com os picos obtidos dos padrões e quantificação pelo método de padrão interno, conforme a equação 1 abaixo:

$$C = A(h.H^{-1}) \quad (1)$$

Onde:

C = concentração do componente (mg.L⁻¹)

A = concentração da substância na solução de referência (mg.L⁻¹)

h = área do pico da substância na amostra

H = área do pico da substância na referência

I = área do pico do padrão interno na referência

i = área do pico do padrão interno na amostra

Os padrões utilizados foram: acetaldeído (00070; 99,5 %; Flucka), etanol (1009711000; 96 %; Merck), laurato de etila (61630; 98,0 %; Aldrich), álcool isoamílico (1009791000; P.A.; Merck), acetato de etila (codigo 34972; 99,7 %; Fluka), acetato de isopropila (45960; 99.5%; Sigma), acetato de propila (46050; 96.0%; Flucka), 2-metil-1-butanol (65990; 98.0%; Flucka), etil-isobutirato (246085; 99.0%; Aldrich), acetato de isobutila (537470; 99.0%; Sigma), hexanona

(103004; 98.0%; Sigma), etil-btirato (19230; 69 98.0%; Flucka), 2-hexanol (52847; 98.5%; Flucka), lactato de etila (W244007; 98 %; Aldrich), acetato de butila (73285; 99,7 %; Flucka), ácido butírico (19215; 99,5 %; Flucka), 1-hexanol (73117; 99,9 %; Flucka), acetato de isoamila (W205532; 97 %; Aldrich), propionato de isobutila (307580; 98.0%; Aldrich), 2-heptanona (537683; 99.0%; Sigma), etilpropionato (112305; 99.0%; Aldrich), 2-octanona (047009; 98.0%; Aldrich), 2-octanol (74858; 99.5%; Aldrich), etil-3-hexanoato (148962; 99.0%; Aldrich), acetato de hexila (25539; 99,7 %; Flucka), 2-fenil-etanol (77861; 99,0 % Aldrich), ácido caprílico (21639; 99,5 %; Flucka), succinato de dietila (07429; 99,5 %; Flucka), octanoato de etila (W244910; 98 %; Aldrich) e decanoato de etila (148970; 99,0 %; Aldrich), conforme descrito por Pietrowski *et al.* (2012).

A composição da solução estoque pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição da solução estoque de referência para análise dos compostos voláteis de fermentado de maçã

Componentes		Concentração
Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura Usual	
Etanal	Acetaldeído	260,0
Etanoato de etila	Acetato de etila	133,8
Etanol	Álcool etílico	15860,0
Propanoato de etila	Etil propionato	41,5
3-metil butanoato de etila	Etil-isobutirato	34,2
Etanoato de propila	Acetato de propila	45,6
Etanoato de isobutila	Acetato de isobutila	35,1
Butanoato de etila	Etil butirato	8,1
Etanoato de butila	Acetato de butila	5,3
Hexanona	Hexanona	30,5
Acetato de isopentila	Acetato de isoamila	31,8
2-heptanona	2-heptanona	30,1
3-metil-1-butanol	Álcool isoamílico	241,6
2-metil-1-butanol	Álcool amílico	32,3

continua

Tabela 1 Composição da solução estoque de referência para análise dos compostos voláteis de fermentado de maçã

Componentes		Concentração
Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura Usual	
Etanoato de hexila	Acetato de hexila	9,0
2-octanona	2-octanona	30,6
3-hexanoato de etila	Etil-3-hexanoato	42,7
2-hidróxi propanoato de etila	Lactato de etila	130,9
1-hexanol	Álcool hexílico	7,6
Octanoato de etila	Caprilato de etila	16,5
Decanoato de etila	Caprato de etila	8,7
Ácido butanoico	Ácido butírico	18,1
1,4-butanoato de etila	Succinato de dietila	10,2
2-fenil etanol	Álcool fenetílico	390,5
Dodecanoato de etila	Laurato de etila	8,1
Ácido octanóico	Ácido caprílico	75,2

Nota: Concentração em mg.100 mL⁻¹

Os dados da análise de voláteis dos fermentados foram submetidos à análise estatística de ANOVA ($p < 0,05$), seguida de teste de Tukey para a detecção de diferença significativa entre as amostras em software Excel[®] 2007.

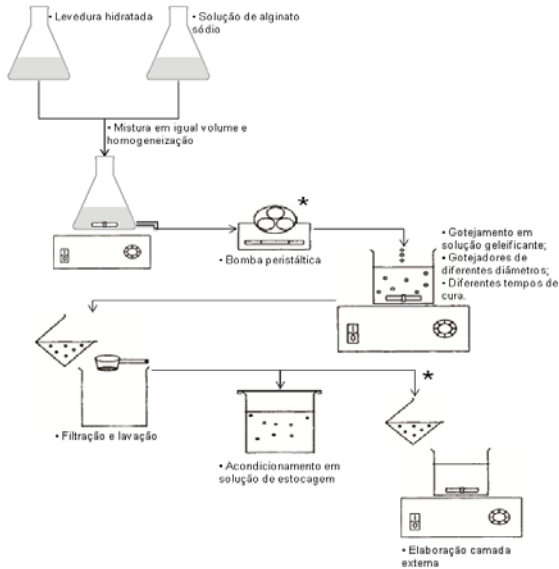
5.2.4 Encapsulação de leveduras em alginato de cálcio

Diversas metodologias para produção de cápsulas por gotejamento foram testadas, dentre elas estão as de Woodward (1988), Gòdia *et al.* (1991), Yamagiwa *et al.* (1992), Huguet *et al.* (1995), Huguet e Dellacherie (1996), Gåserød *et al.* (1998), Tataridis *et al.* (2005), Wen-tao *et al.* (2005), Rakin *et al.* (2009), Chan *et al.* (2011), Shuzhi *et al.* (2011), Zain *et al.* (2011), além da metodologia descrita por Rossi (2006) para encapsulação de biomassa fúngica. Independentemente da metodologia, adotou-se dosagem de levedura final na cápsula em torno de $3,5 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹ de cápsula, conforme resultado obtido por Wen-tao *et al.* (2005), considerando uma redução

de volume de 30 % durante o processo de cura (TATARIDIS *et al.*, 2005).

O sistema de produção das cápsulas pode ser observado na Figura 4 e é composto de um recipiente com saída na base, onde são adicionadas a solução de alginato e a levedura hidratada, em igual volume, homogeneizada por agitação magnética. Pela saída na base do frasco ocorre o fluxo da solução que, através de tubulação flexível, passa por uma bomba peristáltica (opcional) e ao final da tubulação a solução goteja em um recipiente contendo solução de cloreto de cálcio (CaCl_2), também sob agitação. A produção das cápsulas foi realizada de forma asséptica em câmara de fluxo unidirecional horizontal VariFlux 180 (Filtracom S/A). As soluções geleificantes testadas estão apresentadas no Quadro 1. Os tempos de cura testados foram 0, 8 e 20 horas.

Figura 4 Fluxograma de produção das cápsulas de alginato de cálcio, adaptado de Chan *et al.* (1996). *- não foi realizada em todos os ensaios.



Quadro 1 Soluções de geleificação utilizadas.

Solução	Concentração(g.L ⁻¹ ou % v/v)
CaCl ₂	20
CaCl ₂ + NaCl	5,55 + 11,7
CaCl ₂	5,55
CaCl ₂ + HCl + Quitosana	5,55 + 1 + 4
CaCl ₂ →Quitosana→Alginato de sódio	20→5→1,5
CaCl ₂ →Alginato de sódio	20→5

Nota: → uso em etapa subsequente; + uso concomitante

Como solução de estocagem foi utilizada solução aquosa de cloreto de sódio 8,5 g.L⁻¹, solução aquosa de cloreto de sódio 5 g.L⁻¹, água destilada. A solução utilizada variou de acordo com a metodologia, caso não especificado foi utilizada solução aquosa de cloreto de sódio 8,5 g.L⁻¹ descrita por Rossi (2006).

A medição das dimensões das saídas de gotejamento: erlenmeyer com saída para gotejamento, ponteiros para micropipetas de 1000 µL (P1000), 200 µL (P200), 10 µL (P10) foi realizada em estéreo microscópio (Zeiss Stemi DV4). A medição da massa das cápsulas foi realizada em balança analítica (Shimadzu AY220) e suas dimensões em estéreo microscópio, com aumento até 32 vezes, usando o valor da média aritmética simples entre o maior e o menor diâmetro.

Após a elaboração, as cápsulas foram adicionadas à tubos de ensaio contendo 15 mL de suco de maçã reconstituído autoclavados e a concentrações de 13,0 °Brix e 2,9 °Brix, a fim de simular as condições encontradas no suco de maçã natural e na fermentação na própria garrafa (método *Champenoise*), em quantidade proporcional de 1 g de cápsula.garrafa⁻¹, recomendados pela empresa fabricante da levedura encapsulada Proelif (Proenol). Os tubos foram incubados em estufa a 27 °C por 15 dias. Posteriormente as cápsulas foram retiradas, o líquido homogeneizado e realizada a contagem de leveduras (totais e viáveis) presentes no líquido em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio (Zeiss Primo Star), conforme metodologia descrita por Fugelsang e Edwards (2007).

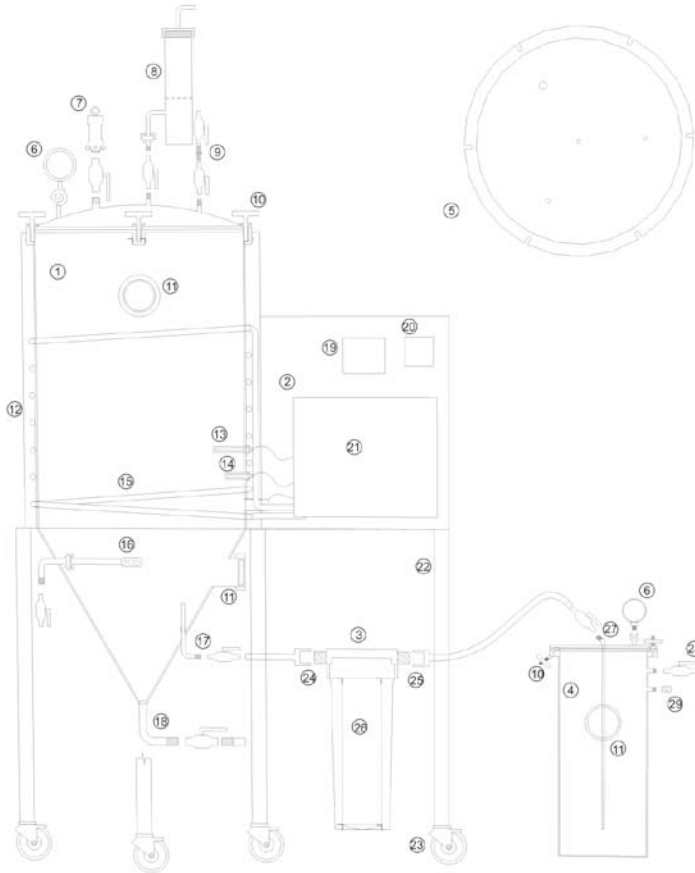
A verificação da viabilidade das leveduras encapsuladas foi realizada de forma qualitativa através de adição de cápsulas produzidas em tubos de ensaio contendo meio YEPD sólido (Agar 20,0 g.L⁻¹, glicose 20,0 g.L⁻¹, peptona 20,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 10,0 g.L⁻¹) e observação de crescimento microbiano em estéreo microscópio ou no próprio líquido fermentado através de contagem em câmara de Neubauer.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Sistema de Fermentação, Filtração e Envase

O sistema de fermentação desenvolvido possui capacidade para 50 L de volume útil, sendo composto por uma câmara cilíndrica em aço inoxidável AISI 304 com parede de 3 mm de espessura dotada de 2 visores de policarbonato para acompanhamento do processo fermentativo, além de duas válvulas laterais para pressurização, aeração ou saída de produto e de uma saída inferior onde é possível a retirada de material. O equipamento possui uma tampa em aço inoxidável AISI 304 com 5 mm de espessura dotada de manômetro, válvula de alívio/controle da pressão, filtro de saída superior com quebrador/separador de espuma e uma válvula. O corpo do fermentador é dotado de 6 travas para lacrar e vedar a tampa do fermentador no mesmo, com o auxílio de *O-ring*. A região cilíndrica do corpo é ainda dotada de sistema de refrigeração por circulação de gás refrigerante em serpentina envolto em isolamento térmico de lã de vidro. Na parte inferior, o corpo possui sensor de temperatura, ligado a um sistema de refrigeração e controlador de temperatura, e sensor de pressão. O controlador de temperatura e sensor de pressão estão ambos ligados a um *datalogger* para registro dos dados, sendo alocados em um invólucro de aço inoxidável, acoplado ao corpo do fermentador juntamente com o sistema de refrigeração. O equipamento é sustentado por 4 suportes com 25 mm de diâmetro em aço dotado de rodas com travas. Em qualquer uma das saídas (laterais e inferiores) é possível acoplar o sistema de filtração, composto de uma carcaça externa transparente de polipropileno e acrílico, uma entrada, uma saída, além de um cartucho de filtração. A câmara isobárica para enchimento de garrafas é construída em aço inoxidável AISI 304 com paredes e tampa com 5 mm de espessura, possui capacidade de enchimento de 1 garrafa por vez. A tampa é dotada de uma válvula que possui um duto em aço com 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura que se prolonga até próximo ao fundo do recipiente para evitar a formação excessiva de espuma, além de manômetro. O corpo possui 1 válvula para entrada/saída, 1 entrada para duto de gás equalizador de pressão e visor em policarbonato, além de 4 travas para lacrar e vedar a tampa da câmara no mesmo, com o auxílio de *O-ring*. O fermentador pode operar com pressão interna até 4 kgf.cm^{-2} e temperaturas de $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ à temperatura ambiente, o sistema de filtração opera com pressão até 4 kgf.cm^{-2} e a câmara de enchimento isobárica com pressão até 6 kgf.cm^{-2} . Detalhes do projeto e imagens do equipamento são apresentados nas Figuras 5 a 9.

Figura 5 Projeto e descrições das partes do fermentador piloto de 50 L.



Nota: (1) corpo do fermentador em aço; (2) sistema de controle e refrigeração; (3) sistema de filtração; (4) câmara isobárica para enchimento; (5) vista superior da tampa do fermentador; (6) manômetro analógico; (7) válvula de alívio/control de pressão; (8) filtro de saída com quebrador de espuma; (9) válvula (1/4") para entrada/saída; (10) trava tampa fermentador; (11) visor – policarbonato; (12) isolamento térmico - lã de vidro; (13) sensor de temperatura; (14) sensor de pressão; (15) serpentina - aço inoxidável; (16) válvula (1/4") para entrada/saída; (17) válvula (1/4") para entrada/saída; (18) válvula (1/2") para saída; (19) *datalogger*; (20) controlador temperatura; (21) sistema de refrigeração; (22) suporte do fermentador em aço inox; (23) rodas com travas; (24) entrada do sistema de filtração; (25) saída do sistema de filtração; (26) cartucho de filtração; (27) válvula (1/4") para entrada de produto; (28) válvula (1/4") para entrada/saída; (29) entrada de gás para equalização de pressão.

Figura 6 Imagem externa do equipamento construído com 50 L de capacidade, composto de câmara de fermentação, tampa e compartimento para controle de temperatura.



Figura 7 Vista superior da tampa do fermentador



Figura 8 Carcaça do sistema de filtração



Figura 9 Vista frontal da câmara de enchimento isobárica



6.2 Análises físico-químicas

Na Tabela 2 pode ser observado o valor médio e o desvio padrão para as análises físico-químicas do mosto de maçã e para as diferentes sidras.

O teor de açúcares redutores para mosto de maçã (MM) e mosto de maçã com nutriente (MMN) foi similar aos valores encontrados por Nogueira e Wosiacki (2012) para suco de maçã despectinizado. A acidez total foi similar aos valores encontrados por Nogueira e Wosiacki (2012) para mosto despectinizado de maçã. A acidez total do mosto de maçã com adição de nutriente também foi de acordo com o resultado desses autores mas cerca de 46 % maior que o mosto de maçã sem adição de nutriente. O nitrogênio total estava de acordo com os valores encontrados para mosto despectinizado de maçã (NOGUEIRA e WOSIACKI, 2012). A adição de nutriente aumentou o teor de nitrogênio em aproximadamente 20 %, mas ainda assim classificado como normal (75-150 mg.L⁻¹), de acordo com Nogueira e Wosiacki (2010).

O teor de fenóis totais obtido para mosto de maçã foi em acordo com o obtido por Nogueira e Wosiacki (2012) para mosto despectinizado de maçã. A adição de nutrientes elevou os fenóis totais para 413,19 mg.L⁻¹, porém ainda dentro dos valores obtidos por esses autores. Do aumento de aproximadamente 100 mg.L⁻¹, cerca de 25 % desse aumento foi devido aos fenóis presentes no nutriente, indicando a presença de compostos que possuem reação frente ao reagente de Folin-Ciocalteu.

O valor de atividade antioxidante do mosto de maçã, com e sem nutriente, foi menor que o obtido por Carvalho *et al.* (2010) para mosto despectinizado de maçã Gala. Esse menor valor pode ser consequência do processo de concentração do suco, que pode envolver, dentre outros processos, a clarificação com gelatina, como previamente reportado por Carvalho *et al.* (2011).

De acordo com a classificação apresentada por Wosiacki *et al.* (2008), o mosto de maçã é classificado como *bitter-sweet* em relação aos teores de acidez total e fenóis totais e como comercial em relação à razão açúcar-acidez e teor de fenóis totais.

Deste modo, o suco concentrado de maçã, quando diluído à concentração de sólidos solúveis próxima ao do suco de maçã é, em todos os aspectos físico-químicos, um suco de maçã e pode ser utilizado como um mosto padrão quando se é desejado estudos e trabalhos ao longo do ano com a mesma matéria-prima bem como de empresas produtoras de sidras localizadas em regiões não produtoras de maçãs

pelo fato de não poderem ser conservadas por longos períodos de tempo sob refrigeração.

Com relação às bebidas fermentadas, a análise de açúcares redutores mostrou que houve o esgotamento total dos açúcares fermentescíveis ($< 1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). A acidez total das amostras estava de acordo com os valores encontrados por Nogueira *et al.* (2003) para sidras comerciais produzidas no Brasil com exceção da amostra CWoS que apresentou AT de $2,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, próxima à obtida por Carvalho *et al.* (2010), porém ambos abaixo ao estabelecido pela legislação brasileira (min. $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) (BRASIL, 2008). O teor de acidez volátil ficou dentro do valor estabelecido pela lei brasileira (máx. $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e abaixo do observado para sidras comerciais (NOGUEIRA *et al.*, 2003). Três amostras (CNP, CP e CWoS) apresentaram teor de álcool superior ao obtido por Nogueira *et al.* (2010) e Nogueira *et al.* (2003) mas abaixo do máximo permitido pela legislação vigente, que é $8 \text{ }^\circ\text{GL}$ (BRASIL, 2008). A amostra CWS apresentou elevado teor de álcool, com $10,0 \text{ }^\circ\text{GL}$, acima do estabelecido na legislação vigente.

Os fenóis totais de 4 amostras de sidra apresentaram redução quando comparadas às amostras MM e MMN, variando de 14 a 37 %. O teor de FT de duas amostras (CP e CWS) foi maior que o encontrado por Carvalho *et al.* (2010) para sidras produzidas a partir de maçãs Gala, uma amostra (CNP) mostrou valores similares e outra amostra (CWoS) apresentou valores menores mas todas as quatro amostras apresentaram valores dentro da faixa encontrada por Nogueira *et al.* (2003) para sidras comerciais brasileiras.

6.3 Análise de compostos voláteis

Na Tabela 3 podem ser observados os compostos aromáticos extraídos do *headspace* para mosto e fermentados de maçã. A análise cromatográfica dos compostos voláteis capturados pelo método do *headspace* identificou no mosto de maçã e nos fermentados a presença de ácidos, ésteres, cetonas, aldeídos e alcoóis.

Comparando os resultados das análises de compostos voláteis com o trabalho de Santos *et al.* (2012) para suco pasteurizado de maçã, a quantidade total de compostos voláteis foi similar, porém o mosto concentrado de maçã apresentou maiores quantidades de compostos de *off-flavor* (etanal, ácidos butanoico e octanóico) e superiores ao limiar de detecção (LEFFINGWELL e ASSOCIATES, 2012) mas também apresentou maiores teores de compostos de aromas frutados e acima do limiar de detecção (MOLINA *et al.*, 2009; LEFFINGWELL e ASSOCIATES, 2012). Esse diferente perfil de compostos voláteis é

provavelmente devido aos processos de produção do suco, como reportado por Franco *et al.* (2003). Trabalhando com frutas cítricas, Bell (2004) reportou que temperaturas de 100 °C por 10 minutos produziu mudanças no *flavor* que foram significativamente diferentes do suco não aquecido reconstituído de toranja e que o tratamento térmico produziu *off-flavors* de aquecido, cozido, abacaxi e metal. Isso pode explicar o aumento desses compostos de *flavor* no suco de maçã concentrado em comparação com o suco pasteurizado utilizado por Santos *et al.* (2012).

A soma das concentrações totais dos voláteis diferiu significativamente entre as linhagens e tratamentos. Após 30 dias de fermentação o tratamento CNP produziu a maior quantidade de compostos voláteis (467,21 mg.L⁻¹), sendo a maior parte desse total de aldeídos (253, 73 mg.L⁻¹) e ésteres (76,62 mg.L⁻¹). Todos os grupos de compostos voláteis apresentaram aumento após os 30 dias de fermentação, não sendo visto o aumento nos compostos ácido butanoico, não detectado em CWS, enquanto 1,4 – butanoato de etila e dodecanoato de etila reduziram na amostra CP.

Comparando com o estudo de Yu *et al.* (2006) onde as diferenças nos compostos voláteis dos fermentados de acordo com a matéria-prima (suco fresco de maçã ou suco concentrado de maçã) foram analisadas, as amostras do presente trabalho apresentaram valores similares aos do suco concentrado, o que está de acordo com o que foi utilizado como matéria-prima. Fan *et al.* (2011) quantificaram um total de 54 compostos voláteis em sidras chinesas e os 3 presentes em maior quantidade foram 3-metil butanol, 2-fenil etanol e ácido hexanóico. Santos *et al.* (2012) também encontraram 3-metil butanol como o composto presente em maior concentração seguido por 2-fenil etanol e 2-hidróxi propanoato de etila em amostras de fermentado enquanto que no presente estudo variou conforme a cepa de levedura. CWS e CWoS produziram altas quantidades de etanal, 3-metil butanol e etanoato de etila, na amostra CNP os maiores foram etanal, ácido butanoico e 3-metil butanol e na amostra CP foram etanal, 3-metil butanol e octanoato de etila. Fan *et al.* (2011) reportaram que ésteres foram encontrados em maior quantidade, para Santos *et al.* (2012) os compostos foram alcoóis e no presente estudo foram aldeídos, principalmente pela presença de alta quantidade de etanal encontrada em nossos produtos. O grupo de compostos voláteis presente na segunda maior quantidade variou de acordo com a cepa da levedura, *S. bayanus* (CN e CNP) com ésteres e *S. uvarum* (CWS e CWoS) com alcoóis. Todas essas variações no perfil de compostos voláteis, de acordo com Loscos *et al.* (2007), são

dependentes da cepa da levedura. Outro fator de influência é o processo à jusante aplicado nos produtos que influenciaram no perfil de voláteis.

Dentre ésteres, etanoato de etila e decanoato de etila foram os ésteres mais comuns em sidras que, de acordo com Pietrowski (2011), são responsáveis pelo aroma de abacaxi e de frutado (uva). Garden-Cerdan e Ancin-Azpilicueta (2005) encontraram octanoato de etila e decanoato de etila em quantidades apreciáveis em amostras com inóculo puro e esses compostos demonstraram atividade odorífica em vinhos produzidos em fermentações com inoculação de leveduras. Esse resultado está de acordo com os resultados do presente estudo onde decanoato de etila aparece como o éster com a segunda maior concentração em três tratamentos e como o primeiro em um tratamento (CP). De acordo com o mesmo estudo de Fan *et al.* (2011), 2-fenil etanol é o composto aromático de maior importância, responsável pelas características frutadas e floral em sidras enquanto 3-metil butanol é considerado o álcool mais importante quantitativamente e ambos compostos foram encontrados em todos os quatro tratamentos realizados, com maior quantidade no tratamento CWS. O conteúdo de 2-fenil etanol foi similar ao encontrado por Garden-Cerdán e Ancin-Azpilicueta (2005) para inóculos puros e mistos para vinhos.

Para Liu e Pilone (2000), acetaldeído é um dos compostos carbonílicos mais significativos formados durante a fermentação com valor médio de 80 mg.L^{-1} para vinho branco e 50 mg.L^{-1} para sidra e para Gil *et al.* (2006), concentração acima de 200 mg.L^{-1} tem efeito negativo no aroma de vinhos. O estudo de Liu e Pilone (2000) afirma que a temperatura afeta a produção de acetaldeído pelas leveduras citando um estudo onde foi observado uma maior produção de acetaldeído a $12 \text{ }^\circ\text{C}$ que a temperaturas mais elevadas em sidras, o que pode explicar essa maior concentração desse composto no presente trabalho.

De acordo com Santos *et al.* (2012), o composto encontrado em maior concentração em sidras Norte-americanas foi o etanoato de hexila, em sidras Espanholas foi 3-metil butanoato de etila e em sidras Chinesas e no estudo de Santos *et al.* (2012) foi 3-metil-1-butanol enquanto que no presente estudo o composto encontrado em maior concentração foi o acetaldeído para todos os tratamentos. Santos *et al.* (2012) concluem que essas diferenças no perfil de voláteis pode ser devido às diferentes cepas de leveduras utilizadas, diferentes cultivares de maçãs, condições e tecnologia de processos e características químicas do mosto.

Comparando os tratamentos CWS e CWoS, a amostra sem estabilizante apresentou maior teor de etanal e uma menor concentração de alcoóis, o que está em acordo com os resultados obtidos por Garden-Cerdán e Ancin-Azpilicueta (2007) para vinhos armazenados por 6 meses, com e sem adição de SO₂. Os pesquisadores atribuem esse resultado à oxidação química do etanol em etanal. Para ácidos e ésteres, especialmente para etanoato de etila, o presente trabalho apresentou perfil distinto, houve aumento de ácidos e diminuição de ésteres.

Entre amostras com mesmo tratamento de conservação mas com diferente cepa de levedura o comportamento foi distinto. Mateos *et al.* (2006) analisaram várias composições de mosto e cepas de leveduras na composição de compostos voláteis em vinhos e concluíram que a produção desses compostos durante a fermentação depende principalmente da composição do mosto e condições de fermentação, mas pode depender da cepa de levedura utilizada. A influência da levedura na composição dos voláteis foi estudada por Antonelli *et al.* (1999) que encontraram grandes variações no conteúdo de acetaldeído indiferente à cepa de levedura, com uma cepa de *S. bayanus* produzindo a maior quantidade, próxima ao encontrado no presente trabalho.

Analisando amostras termicamente tratadas e não termicamente tratadas, houveram grandes diferenças no perfil de compostos voláteis no que diz respeito a quantidade de voláteis com a amostra termicamente tratada apresentando uma redução de 23 % no total em relação à amostra não termicamente tratada. Gao *et al.* (2010) reportaram que o tratamento térmico causou grande deterioração de aromas em molho de soja porém, em nosso estudo ocorreu, principalmente, a deterioração de compostos de *off-flavor* como ácidos butanoico e octanoico e etanal e até mesmo aumento de compostos de aroma frutado como o 3-metil butanol, etanoato de etila, decanoato de etila.

Tabela 2 Análise Físico-química do mosto de maçã e de diferentes tratamentos de sidras. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para triplicatas. Médias com mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Parâmetro	MM	MMN	CNP	CP	CWS	CWoS
AR	9,77 \pm 0,67	9,77 \pm 0,67	0,75 ^a \pm 0,09	0,44 ^{ab} \pm 0,02	0,81 ^a \pm 0,14	0,43 ^{ab} \pm 0,02
AT	0,26 \pm 0,00	0,38 \pm 0,01	0,40 ^c \pm 0,00	0,37 ^d \pm 0,02	0,49 ^b \pm 0,00	0,21 ^e \pm 0,00
AV	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,07 ^a \pm 0,01	0,06 ^a \pm 0,01	0,07 ^a \pm 0,01	0,06 ^a \pm 0,00
NT	114,33 \pm 0,00	136,87 \pm 1,05	91,74 ^a \pm 1,48	96,92 ^a \pm 3,14	83,00 ^b \pm 1,80	71,02 ^c \pm 4,19
Etanol	0,30 \pm 0,00	0,30 \pm 0,00	7,80 ^b \pm 0,00	8,05 ^b \pm 0,07	10,00 ^a \pm 0,00	6,90 ^c \pm 0,00
FT	311,59 \pm 42,20	413,19 \pm 3,88	275,36 ^{ab} \pm 19,23	352,54 ^a \pm 13,05	358,70 ^a \pm 16,21	261,96 ^{ab} \pm 9,79
AA	2344,89 \pm 220,36	2329,69 \pm 48,37	2329,69 ^a \pm 48,37	2181,47 ^{ab} \pm 85,99	2424,70 ^a \pm 128,99	2135,87 ^{ab} \pm 32,25

Notas: AR – açúcar redutor; AT – acidez total; AV – acidez volátil; FT – fenóis totais; AA – atividade antioxidante.

AR, AT, AV em g/100 mL⁻¹; NT em mg.L⁻¹; Etanol em °GL; FT em mg.L⁻¹; AA em μ mol mL⁻¹

MM – mosto de maçã; MMN – mosto de maçã com nutriente; CNP – Charnat não pasteurizado; CP – Charnat pasteurizado; CWS – Cryoaromae sem estabilizante; CWS – Cryoaromae com estabilizante

Tabela 3 Análise cromatográfica de mosto de maçã e de diferentes tratamentos de sidras. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para duplicatas. Médias com mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Composto	TR	MM	CNP	Amostra			Limiar Odor/Flavor
				CP	CWS	CWOS	
Concentração							
Ácidos							
Butanóico	14,943	0,91 \pm 0,73	56,09 ^a \pm 7,77	24,44 ^b \pm 3,84	ND	8,27 ^c \pm 0,81	6,2
Octanóico	21,253	3,35 \pm 2,75	9,91 ^a \pm 5,91	11,08 ^a \pm 7,54	11,62 ^a \pm 10,15	14,28 ^a \pm 0,94	5,3
Total		4,26	66	35,52	11,62	22,55	
Alcoóis							
3-metil-1-butanol	8,053	1,53 \pm 0,18	53,34 ^b \pm 5,19	63,80 ^b \pm 8,17	89,01 ^a \pm 0,76	54,40 ^b \pm 3,13	0,17
2-hexanol	8,303	ND	3,31 ^{ab} \pm 0,41	4,24 ^a \pm 0,66	4,65 ^a \pm 0,14	2,50 ^{ab} \pm 0,11	-
1-hexanol	10,46	ND	0,41 ^a \pm 0,57	ND	ND	ND	2,5
2-fenil etanol	17,923	2,11 \pm 1,74	13,58 ^a \pm 1,53	11,96 ^a \pm 0,29	20,98 ^a \pm 3,90	8,41 ^{ab} \pm 7,91	0,75-1,10
Total		3,64	70,64	80	114,64	65,31	
Aldeídos							
Etanal	1,48	10,35 \pm 2,24	253,73 ^a \pm 24,36	123,67 ^b \pm 11,71	107,47 ^b \pm 3,26	130,96 ^b \pm 7,30	0,015-0,12
Total		10,35	253,73	123,67	107,45	130,96	
Cetonas							
Hexanona	5,323	ND	ND	0,82 ^a \pm 0,14	ND	1,20 ^a \pm 0,65	-
2-heptanona	7,337	0,03 \pm 0,02	0,03 ^a \pm 0,01	0,03 ^a \pm 0,03	0,02 ^a \pm 0,03	0,04 ^a \pm 0,02	1
2-octanona	9,353	0,01 \pm 0,00	0,19 ^a \pm 0,04	0,11 ^b \pm 0,03	0,06 ^b \pm 0,00	0,05 ^b \pm 0,00	0,15-1,00
Total		0,04	0,22	0,96	0,08	1,29	

Continua

Continuação

Composto	TR	MM	CNP	Amostra			Limiar Odor/Flavor
				CP	CWS	CWOS	
Concentração							
Ésteres							
Etanolato de etila	2,107	1,68 ± 0,38	27,54 ^b ± 1,99	37,34 ^a ± 3,52	41,42 ^a ± 0,58	23,32 ^b ± 1,32	3,00-6,60
Butanolato de etila 3-metil butanolato de etila	3,853	0,16 ± 0,18	0,22 ^c ± 0,06	0,31 ^a ± 0,05	0,13 ^a ± 0,00	0,38 ^a ± 0,20	0,45
	5,923	0,33 ± 0,07	1,03 ^b ± 0,10	0,50 ^c ± 0,10	2,20 ^a ± 0,10	0,39 ^c ± 0,24	0,002
Etanolato de hexila	9,147	0,03 ± 0,02	0,07 ^a ± 0,01	0,09 ^a ± 0,01	0,09 ^a ± 0,01	0,05 ^{ab} ± 0,00	0,002
Hexanolato de etila 2-hidroxi propanoato de etila	9,767	0,01 ± 0,01	NID	NID	NID	0,01 ^a ± 0,00	0,001
	10,58	ND	9,44 ^a ± 12,02	12,84 ^a ± 13,76	1,54 ^a ± 2,17	2,54 ^a ± 3,60	-
Octanoato de etila	11,713	0,03 ± 0,02	5,83 ^a ± 1,21	7,88 ^a ± 1,66	6,67 ^a ± 0,84	3,34 ^{ab} ± 0,70	-
Decanoato de etila 1,4-butanolato de etila	14,337	0,33 ± 0,26	23,69 ^b ± 3,51	56,84 ^a ± 8,51	18,78 ^b ± 1,97	15,38 ^b ± 0,29	-
	15,147	3,31 ± 0,17	4,42 ^a ± 0,19	1,98 ^a ± 0,53	3,84 ^a ± 1,65	3,07 ^a ± 0,24	-
Dodecanoato de etila	20,42	2,61 ± 0,52	4,38 ^a ± 1,27	1,66 ^b ± 0,30	5,26 ^a ± 0,12	4,43 ^a ± 0,23	-
Total		8,49	76,62	119,44	79,93	52,91	
Compostos Voláteis Totais		26,78	467,21	359,59	313,72	273,02	

Nota: TR – Tempo de Retenção (min); Concentração (mg.L⁻¹); ND – Não detectado
MM – mosto de maçã; MMN – mosto de maçã com nutriente; CNP – Charnat não pasteurizado; CP – Charnat pasteurizado; CWS – Cryoaromae sem estabilizante; CWS – Cryoaromae com estabilizante

6.4 Encapsulação de leveduras em alginato de cálcio

Na Tabela 4 pode ser observado o diâmetro médio das saídas de gotejamento testadas, na Tabela 5 são apresentados valores de algumas características de cápsulas obtidas a partir das saídas apresentadas na Tabela 4.

Como pode ser observado na Tabela 5, o diâmetro das cápsulas variou de acordo com o diâmetro da saída de gotejamento, o que está de acordo com a lei de Tate modificada, a qual descreve que o diâmetro da cápsula é proporcional à raiz cúbica do diâmetro externo da saída de gotejamento (CHAN *et al.*, 2009).

Tabela 4 Valores das dimensões das saídas de gotejamento utilizadas nos ensaios de encapsulação. São apresentados os valores médios \pm desvio padrão para cinco repetições.

Saída de gotejamento	Diâmetro (mm)	
	Externo	Interno
Gotejador	5,8006 \pm 0,0703	2,7619 \pm 0,2234
P1000	1,5688 \pm 0,0140	0,8063 \pm 0,0261
P200	1,0625 \pm 0,0856	0,4500 \pm 0,0171
P10	0,6563 \pm 0,0221	0,3844 \pm 0,0261

Tabela 5 Característica de cápsulas produzidas por gotejamento por gravidade em solução de cloreto de cálcio 20 g.L⁻¹ de acordo com as saídas de gotejamento. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para cinco repetições.

Saídas de gotejamento	Massa (g)	Diâmetro médio (mm)	Volume (mm ³)
Erlenmeyer	0,0426 \pm 0,0057	4,5000 \pm 0,1214	47,80 \pm 3,81
P1000	0,0111 \pm 0,0025	3,0188 \pm 0,0648	14,42 \pm 0,92
P200	0,0064 \pm 0,0010	2,5094 \pm 0,0212	8,28 \pm 0,21
P10	0,0044 \pm 0,0008	2,2813 \pm 0,0644	6,23 \pm 0,60

Vários autores utilizando o método de gotejamento por gravidade obtiveram cápsulas com diâmetro entre 2 e 4,3 mm, com grande parte dos trabalhos com diâmetro próximo a 3 mm (FUMI *et al.*, 1987; FUMI *et al.*, 1988; YAMAGIWA *et al.*, 1992; CHANG *et al.*, 1996; YOKOTSUKA *et al.*, 1997; CHANG *et al.*, 1998; TATARIDIS *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; CHA *et al.*, 2012). No presente trabalho foi possível obter cápsulas com diferentes tamanhos, variando de 2,28 a 4,50 mm de diâmetro para cápsulas produzidas por

gotejamento por gravidade e entre 2,96 e 3,86 mm de diâmetro para as produzidas com auxílio de bomba peristáltica. Cápsulas P10 e P200 gotejadas por gravidade apresentaram diâmetro médio de 2,28 mm e 2,51 mm, respectivamente, enquanto cápsulas produzidas com as mesmas saídas de gotejamento, porém com auxílio de bomba peristáltica o diâmetro médio foi de 2,96 mm para a saída P10 e 3,82 mm para a saída P200 mesmo com maior tempo de cura e consequente redução do diâmetro. Essa diferença no diâmetro final das cápsulas produzidas com auxílio de bomba peristáltica pode ser devido ao fato de haver um maior fluxo de massa a somar à força gravitacional, formando esferas de maiores diâmetros antes de ocorrer a igualdade das forças e desprendimento da gota, como pode ser observado na Figura 6. Além desse fato, no ensaio experimental com a utilização de bomba peristáltica a ponta do tubo capilar foi posicionada de forma paralela ao plano da solução de cloreto ao invés de modo perpendicular, aumentando a área de contato da gota com a superfície do gotejador e, consequentemente, aumentando a tensão superficial, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 10 Balanço de força na ponta de gotejamento baseada na lei de Tate.
 Fonte: LEE *et al.* (2008).

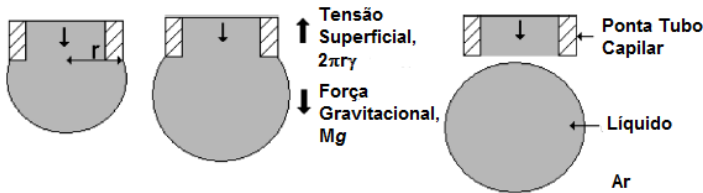
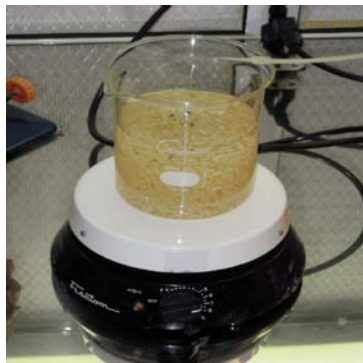


Figura 11 Posicionamento paralelo à solução de cloreto de cálcio da ponta de gotejamento.



Na Tabela 6 podem ser visualizadas as dimensões de cápsulas produzidas com duas saídas de gotejamento, P10 e P200, e dois diferentes tempos de cura, 8 e 20 horas.

Para cápsulas de menor diâmetro produzidas pela saída P10 houve diferença significativa entre os tratamentos, porém o resultado foi o inverso do esperado, cápsulas com maior tempo de cura apresentaram maior diâmetro e massa apesar de ambos tratamentos terem sido realizados a partir do mesmo ensaio com retirada de alíquotas nos tempos estabelecidos. Cápsulas produzidas por uma saída de gotejamento maior (P200) também apresentaram o mesmo comportamento, porém os valores não foram significativamente diferentes, levando à conclusão que para cápsulas produzidas com saída de gotejamento P200, a partir de 8 horas de cura não houve alteração das características das cápsulas produzidas.

Tabela 6 Característica de cápsulas produzidas por gotejamento com auxílio de bomba peristáltica e curadas por diferentes tempos em solução de cloreto de cálcio 20 g.L⁻¹. Resultados são apresentados por valor médio \pm desvio padrão para vinte repetições. Médias com mesma letra para a mesma saída de gotejamento não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Saídas de gotejamento	Tempo de cura (h)	Massa (g)	Diâmetro médio (mm)	Volume (mm ³)
P-10	8	0,0117 ^{a1} \pm 0,0025	2,9603 ^{a1} \pm 0,2131	13,779 ^{a1} \pm 2,776
P-10	20	0,0141 ^{a2} \pm 0,0025	3,1256 ^{a2} \pm 0,1847	16,148 ^{a2} \pm 2,823
P-200	8	0,0244 ^b \pm 0,0013	3,8250 ^b \pm 0,0913	29,350 ^b \pm 2,132
P-200	20	0,0250 ^b \pm 0,0022	3,8583 ^b \pm 0,1118	30,146 ^b \pm 2,524

Em ensaios onde foi feita a camada externa com biopolímero, cápsulas com diâmetros maiores, saídas de gotejamento erlenmeyer e P1000, apresentaram rompimento da película, como pode ser observado na Figura 8. O estudo de Wen-tao *et al.* (2005) relata que cápsulas com núcleo sólido com diâmetros superiores a 1000 recobertas com membranas de biopolímero apresentaram rompimento devido à expansão da microcápsula e conseqüente liberação de células.

Figura 12 Rompimento de camada externa de alginato em cápsula com 3 mm de diâmetro e liberação de células (depósito presente no fundo do tubo)



70 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Acompanhamento da viabilidade de leveduras encapsuladas mantidas sob refrigeração foi realizado por 8 meses, apresentando leveduras viáveis no meio de cultura, como pode ser observado nas Figuras 9 e 10. Estudo realizado por Rossi (2006) sobre viabilidade de encapsulados de fungos ectomicorrízicos em alginato de cálcio apresentaram 100 % de viabilidade após 6 meses conservados sob refrigeração.

Figura 13 Cápsula de alginato de cálcio de cerca de 4,5 mm após 15 dias de fermentação



Figura 14 Imagem de lâmina do meio de cultura corado com azul de metileno para contagem de leveduras presentes totais e viáveis

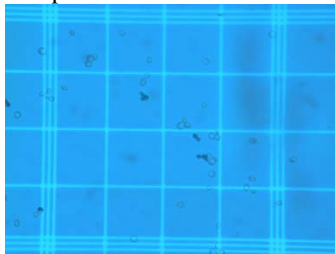
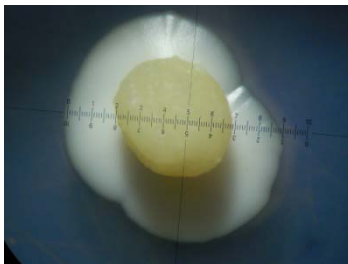


Figura 15 Imagem do crescimento de leveduras fora da cápsula em meio de cultura YEPD sólido para verificação da viabilidade dos microrganismos (tratamento P200 20h).



A liberação de células ocorreu em todos os ensaios realizados, como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8. No caso das amostras P200⁴ e P200⁵ apresentadas na Tabela 7 houve liberação de células para o líquido, porém o total de células viáveis foi nulo. Apesar de o resultado ter sido melhor que o restante onde pelo menos 5.10^5 UFC.mL⁻¹ viáveis foram liberados no meio, ainda houve formação de resíduo de células provenientes de leveduras. Nesse estudo não foi possível o estudo comparativo com o encapsulado comercial pois ocorreu contaminação com bactérias, uma vez que o produto comercial não se encontra estéril. Apesar de não ter sido possível comparação com produto comercial, as duas amostras citadas apresentaram resultados interessantes para possíveis aplicações em ensaios de fermentação alcoólica em mostos com alta concentração de sólidos solúveis totais.

Tabela 7 Contagem de leveduras viáveis em suco 13 °Brix

Amostra	UFC.mL ⁻¹	Amostra	UFC.mL ⁻¹
P10 ¹	$1,10.10^6$	P200 ⁴	0
P10 ²	$5,50.10^5$	P200 ⁵	0
P10 ³	$2,40.10^6$	P200 8h	$1,20.10^7$
P10 0h	$5,00.10^5$	P10 20h	$1,86.10^7$
Erlenmeyer	$2,10.10^6$		

Nota: ¹ - CaCl₂ 5,55 g.L⁻¹; ² - CaCl₂ 5,55 g.L⁻¹ + NaCl 11,7 g.L⁻¹; ³ - CaCl₂ 5,55 g.L⁻¹ + HCl 1 % + quitosana 4 g.L⁻¹; ⁴ - CaCl₂ 20 g.L⁻¹ 8h → Quitosana 5 g.L⁻¹ → Alginato de sódio 1,5 g.L⁻¹; ⁵ - CaCl₂ 20 g.L⁻¹ 8h → Alginato de sódio 5 g.L⁻¹

Tabela 8 Contagem de leveduras viáveis em suco 2,9 °Brix

Amostra	UFC.mL ⁻¹	Amostra	UFC.mL ⁻¹
P10 ¹	$1,49.10^7$	P200 ⁴	$1,75.10^5$
P10 ²	$1,32.10^7$	P200 ⁵	$3,75.10^5$
P10 ³	$2,06.10^7$	P10 20h	$2,38.10^6$
P10 0h	$1,98.10^7$	Proelif	$1,31.10^7$
Erlenmeyer	$1,47.10^7$		

Nota: ¹ - CaCl₂ 5,55 g.L⁻¹; ² - CaCl₂ 5,55 g.L⁻¹ + NaCl 11,7 g.L⁻¹; ³ - CaCl₂ 5,55 g.L⁻¹ + HCl 1 % + quitosana 4 g.L⁻¹; ⁴ - CaCl₂ 20 g.L⁻¹ 8h → Quitosana 5 g.L⁻¹ → Alginato de sódio 1,5 g.L⁻¹; ⁵ - CaCl₂ 20 g.L⁻¹ 8h → Alginato de sódio 5 g.L⁻¹

No estudo onde foi simulado uma concentração de sólidos solúveis próxima ao encontrado pelo microrganismo quando realizada a fermentação na própria garrafa, como é o caso do método Champenoise, todos os ensaios apresentaram alta concentração de leveduras viáveis no meio líquido, com as amostras P200⁴, P200⁵ e P10 20h apresentando os melhores resultados com $1,75.10^5$, $3,75.10^5$ e $2,38.10^6$ UFC.mL⁻¹, respectivamente, com contagens de leveduras menores que o produto

comercial “Proelif”. Os demais tratamentos apresentaram contagens na mesma ordem de grandeza da cápsula comercial, em torno de 1.10^7 UFC.mL⁻¹.

Em ensaios com diferentes tempos de cura, para P10 0h e P10 20h, o primeiro tratamento apresentou resultado cerca 97 % melhor quando inoculado em suco de maçã 13 °Brix e o segundo, quando inoculado em suco de maçã 2,9 °Brix, cerca de 88 %.

Comparando os ensaios P10¹ e P10² onde foi avaliada a influência de cloreto de sódio na capacidade de retenção celular, foi notada uma menor liberação celular, 50 % menor, em cápsulas com a presença de NaCl inoculadas em suco de maçã 13 °Brix, enquanto no ensaio com suco de maçã 2,9 °Brix os valores ficaram na mesma ordem de grandeza, porém menor para cápsulas com presença do sal de sódio, cerca de 12 % menor. Indicando efeito positivo dos íons de sódio presentes na solução geleificante na formação das cápsulas, que Gaserød *et al.* (1998) atribuem à formação de cápsulas homogêneas, apesar de o sal competir por sítios de ligação com o cálcio pelos grupos carboxílicos das moléculas de alginato (GASERØD *et al.*, 1998).

No presente estudo a adição de quitosana na solução geleificante teve efeito negativo na retenção de células quando comparada com cápsulas que continham a substância em sua formulação. Gaserød *et al.* (1998) justificam esse resultado pelo fato de, no caso de quitosana na solução de geleificação, a membrana de quitosana é formada instantaneamente na interface das duas soluções de polímeros levando a membranas mais finas enquanto que realizando primeiramente a elaboração da cápsula e posterior formação da membrana de quitosana a rede de gel é mantida durante a reação da quitosana com o cálcio, permitindo uma difusão das moléculas de quitosana para dentro do gel.

Utilizando 4.10^6 UFC.mL de gel⁻¹, Yokotsuka *et al.* (1997) obtiveram aproximadamente 1.10^4 UFC viáveis.mL de vinho⁻¹, enquanto que ao utilizar $4,6.10^8$ UFC.mL de gel⁻¹ obtiveram apenas cerca de 100 UFC viáveis.mL de vinho⁻¹. Gòdia *et al.* (1991) mostraram que apenas ao se utilizar cápsulas simples, a partir de 10^9 células.g de gel⁻¹, utilizando uma dosagem de 10-12 g de cápsulas.garrafa⁻¹ foi possível obter espumante final livre de células. Enquanto que ao se utilizar cápsulas com camada externa, uma dosagem de 6 g.garrafa⁻¹ ou mais foi possível obter o mesmo resultado. Tataridis *et al.* (2005) alcançaram dosagem de 2,2 g.garrafa⁻¹ com cápsulas com aproximadamente 2.10^9 células.g de gel⁻¹. Segundo Tataridis *et al.* (2005) duas das principais razões de escape de células são baixa concentração celular e elevado teor de açúcares, que permitem a

reprodução de leveduras e em alguns casos danos à estrutura e integridade da cápsula. Fumi *et al.* (1987) encontrou resultados contrários a Tataridis *et al.* (2005), com a liberação de células ao meio sendo diretamente proporcional à densidade celular utilizada, inversamente proporcional à concentração da solução de alginato e dependente da cepa de levedura. Wen-tao *et al.* (2005), da mesma forma que Fumi *et al.* (1987) obtiveram melhores resultados ao utilizar densidade celular de 3.10^6 UFC.mL de cápsulas⁻¹ justamente por permitir melhor proliferação de células, metabolismo e formação de produto.

Em face às contradições apresentadas por diferentes trabalhos, os resultados preliminares do presente estudo permitiram as seguintes conclusões: foi possível obter leveduras viáveis após 8 meses de armazenamento sob refrigeração; melhores resultados foram obtidos em ensaios em substrato com maior concentração de açúcar para cápsulas produzidas com as saídas de gotejamento P200 e P10 e resultado inverso para cápsulas produzidas com erlenmeyer com saída de gotejamento; cápsulas revestidas com camada externa de biopolímero apresentaram menor liberação de células em ambos ensaios, atingindo zero UFC.mL⁻¹ viáveis e capacidade de retenção de leveduras superior ao produto comercial Proelif no ensaio simulando o método Champenoise. A adição de cloreto de sódio na concentração de 11,7 g.L⁻¹ apresentou efeito positivo na retenção celular. A formação de membrana de quitosana na cápsula deve ser realizada em uma etapa posterior.

7 Conclusões

1. Sistema compreendido por fermentador, sistema de filtração e envase isobárico construído, configurado e funcional.
2. Limites de temperatura e pressão do fermentador estabelecidos, $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a temperatura ambiente e até 4 kgf.cm^{-2} . Limite de pressão do sistema de filtração e envase isobárico estabelecidos em 4 kgf.cm^{-2} e 6 kgf.cm^{-2} , respectivamente.
3. Suco concentrado de maçã se apresenta como uma matéria prima utilizável para produção de sidra visto que apresentou características físico-químicas similares ao suco de maçã fresco despectinizado.
4. Cepa de levedura e método de conservação influencia o perfil volátil de sidra. Essas variáveis podem aumentar a produção de compostos de off-flavor.
5. Processamento térmico ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min.) reduziu a concentração compostos de off-flavor como ácidos butanoico e octanoico e etanal e aumentou a concentração de compostos de aroma frutado como o 3-metil butanol, etanoato de etila, decanoato de etila de sidra fermentada a baixa temperatura e estocados por 6 meses.
6. Leveduras viáveis em cápsulas de 4,5 mm de diâmetro de alginato de cálcio estocadas por 8 meses sob refrigeração.
7. Para saídas de gotejamento P200, maior tempo de cura, superior a 8 horas, não apresentou diferença significativa nas características físicas da cápsula.
8. Adição de cloreto de sódio $11,7\text{ g.L}^{-1}$ melhorou a capacidade de retenção celular de cápsulas produzidas a partir da saída de gotejamento P10.
9. Formação de membrana de quitosana deve ser realizada em etapa posterior à elaboração das cápsulas.
10. Melhores resultados foram obtidos em ensaios em substrato com maior concentração de açúcar para cápsulas produzidas com saídas de gotejamento P200 e P10, com zero UFC.mL^{-1} de leveduras viáveis no líquido para cápsulas recobertas com biopolímero.
11. Cápsulas produzidas com saídas de gotejamento P200 e P10 20h apresentaram menor liberação de células que o produto comercial no experimento simulando o processo Champenoise.

8 Referências

- AEB GROUP S.A. Disponível em <http://www.aeb-group.com>. Acesso em 10/09/2011.
- ANTONELLI, A., CASTELLARI, L., ZAMBONELLI, C., CARNACINI, A. Yeast influence on volatile composition of wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.1139-1144, 1999.
- Associação Brasileira de Bebidas – ABRABE. Disponível em <http://www.abrabe.org.br>. Acesso em 11/09/2011.
- Associação Brasileira de Produtores de Maças – ABPM. <<http://www.abpm.org.br>>. Setembro, 2011.
- BELL, W. A-M. **Examination of aroma volatiles formed from thermal processing of Florida reconstituted grapefruit juice**. Dissertação de Mestrado. Florida: University of Florida, 2004.
- BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239 (1), p.70-76, 1996.
- BLANCO-GOMIS, D.; MANGAS-ALONSO, J. J.; JUNCO-CORUJEDO, S.; GUTIÉRREZ-ALVARÉZ, M. D. Characterization of sparkling cider by yeast type used in taking foam on the basis of polypeptide content and foam characteristics. **Food Chemistry**, v.115, p.375-379, 2009.
- BOYLSTON, T. D. Fruit Juices. In: HUI, Y. H. **Handbook of Food Products Manufacturing – health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables**. USA: John Wiley & Sons, p. 847-866, 2007.
- BRAGA, H. J., SILVA Jr, V. P., PANDOLFO, C., PEREIRA, E. S. Zoneamento de riscos climáticos da cultura da maçã no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Agrometeorologia (Passo Fundo)**, v.9 (3), p.439-445, 2001.
- BRASIL. Brasília, Lei nº 6.871, de 04 de Junho de 2009. **Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**. Diário Oficial da União. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 64, de 23 de Abril de 2008. **Regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê**. Diário Oficial da União. 2008.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Levantamento sistemático da produção agrícola**, v. 25, n. 2, 88p. Rio de Janeiro, 2012.

CARRUTI, D. S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2001.

CARVALHO, C. V. **Espumantes de maçã obtidos pelos processos Asti, Charmat e Champenoise**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa – PR, 2009.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL et al. **Biotecnologia industrial**: Engenharia Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2007. Cap. 9, p. 193-204.

CARVALHO, J. R. F., SILVA, K. M., SIMÕES, D. R. S., WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado frísante de maçã com características semelhantes à sidra francesa. **Boletim CEPPA**, v.28 (1), p.97-114, 2010.

CARVALHO, J. R., SILVA, K. M., BRAGA, C. M., ALBERTI, A., WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A. Efeito da clarificação com gelatina no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de fermentados de maçãs. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14 (1), p.41-49, 2011.

CHA, C.; KIM, S. R.; JIN, Y-S.; KONG, H. Tuning structural durability of yeast-encapsulating alginate beads with interpenetrating network for sustained bioethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.109 (1), p.63-73, 2012.

CHAN, E-S.; LEE, B-B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of Ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, p. 63-72, 2009.

CHAN, E-S.; WONG, S. W.; LEE, P.P.; LEE, J. S.; TI, T. B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S. H.; YIM, Z. H. Effect of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of the encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 225-232, 2011.

CHANG, H. N.; SEONG, G. H.; YOO, I-K.; PARK, J. K.; SEO, J-H. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 157-162, 1996.

CHANG, H-N.; SEONG, G-H.; YOO, I-K.; PARK, J-K.; SEO, J-H. Korea Advanced Institute of Science & Technology, Taejeon, Rep. of

Korea. **Method for immobilization of whole microbial cells in calcium alginate capsules.** Int. Cl. C12N 11/10. Patent Number: 5766907. June 16, 1998. 9p.

Compendium of Chemical Terminology Gold Book. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Versão 2.3.2, 2012.

CORTÉS, S., SALGADO, J. M., RIVAS, B., TORRADP, A. M., DOMÍNGUEZ, J. M. Fermentation kinetics and chemical characterisation of *vino tostado*, a traditional sweet wine from Galicia (NW Spain). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.121-131, 2010.

DURIEUX, A., NICOLAY, X., SIMON, J-P. (2005) Application of Immobilisation technology to cider production: a review. **Application of Cell Immobilisation Biotechnology**, p. 275-284.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI. Disponível em <http://www.epagri.sc.gov.br>. Acesso em 11/09/2011

FAJARDO-OCHOA, R.; OSUNA-CASTRO, J. A.; VELÁZQUEZ-MENDOZA, C. V.; ESCALANTE-MINAKATA, P.; IBARRA-JUNQUERA, V. Inmovilización de células y enzimas. **Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 3, n. 6, 2011.

FAN, W., XU, Y., HAN, Y. Quantification of volatile compounds in Chinese ciders by stir bar sorptive extraction (SBSE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of the Institute of Brewing**, v.117 (1), p.61-66, 2011.

FRANCIS, I. L., SEFTON, M. A., WILLIAMS, P. J. The sensory effects of pre or post fermentation thermal processing on Chardonnay and Semillon wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.45 (2), p.243-251, 1994.

FRANCO, M. R. B., JANZANTTI, N. S., WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23 (3), p.523-528, 2003.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures.** 2 ed, New York: Springer Science Business Media. p.226-232, 2007.

FUMI, M. D.; TRIOLI, G. ; COLOMBI, M. G. ; COLAGRANDE, O. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 4, 1988.

- GAO, X-L., CUI, C., ZHAO, H-F., ZHAO, M-M., YANG, L., REN, J-Y. Changes in volatile aroma compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment. **Food Science and Biotechnology**, p.19 (4), p.889-898, 2010.
- GARDE-CERDÁN, T., ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research and Technology**, v.222, p.15-25, 2006.
- GARDE-CERDÁN, T., ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines. **Food Control**, v.18, p.1501-1506, 2007.
- GÅSERØD, O.; SMIDRØD, O.; BRÆK, G. S. Microcapsules of alginate chitosan I – A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials**, v. 19, p. 1815-1825, 1998.
- GIL, M., CABELLOS, J. M., ARROYO, T., PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.145-153, 2006.
- GÒDIA, F.; CASAS, C.; SOLÀ, C. Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 7, n. 5, 1991.
- HERRERO, M.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Volatile Compounds in Cider: Inoculation Time and Fermentation Temperature Effects. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 112 (3), p. 210-214, 2006.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coord. Zenebon, O., Pascuet, N. S. and Tiglea, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 1020 p., 2008.
- LEE, B-B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E-S. A critical review: surface and interfacial tension measurement by the drop weight method. **Chemical Engineering Communications**, v.195, p.889-924, 2008.
- LEE, K-H.; CHOI, I. S.; KIM, Y-G.; YANG, D-J.; BAE, H-J. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. **Bioresource Technology**, v.102, p.8191-8198, 2011.
- LEFFINGWELL & ASSOCIATES. **Odor & Flavor detection thresholds in water**. <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm> Acesso em novembro, 2012.
- LLARAUDÓ, J.; ROZÉS, N.; BOBET, R.; MAS, A.; CONSTANTINI, M. Low Temperature Alcoholic Fermentations in High Sugar Concentration Grape Musts. **Journal of Food Science**, v. 67 p. 269-273, 2002.

- LLAUDÓ, J. M.; ROZÉS, N.; CONSTANTÍ, M.; MAS, A. Study of Some *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Winemaking after preadaptation at Low Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1003-1011, 2005.
- LOSCOS, N., HERNANDÉZ-ORTE, P., CACHO, J., FERREIRA, V. Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from non floral grape odorless flavor precursors fractions, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.6674-6684, 2007.
- MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M. Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. **Food Chemistry**, v. 80 p. 109-113, 2003
- MANGAS, J., GONZÁLEZ, M. P., BLANCO, D. Influence of cider-making technology on low-boiling-point volatile compounds. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v.197 (6), p.522-524, 1993.
- MARGARITIS, A.; KILONZO, P. M. Production of ethanol using immobilized cell bioreactor systems. **Applications of Cell Immobilization Biotechnology**, p. 375-405, 2005.
- 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.151-157, 2006.
- MC HUGH, D. J. Production, properties and uses of alginates. In: Production and utilization of products from commercial seaweeds. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 288. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1987.
- MOLINA, A. M., GUADALUPE, V., VARELA, C., SWIGERS, J. H., PRETORIUS, I. S., AGOSIN, E. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. **Food Chemistry**, v.117, p.189-195, 2009.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **The journal of Biological Chemistry**, v.2 (153), p.375-380, 1944.
- NOGUEIRA, A., PRESTES, R. A., SIMÕES, D. R. S., DRILLEAU, J. F., WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina - Ciências Agrárias**, v.24 (2), p.289-298, 2003.

- NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G. Sidra. In: Venturini Filho, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**, São Paulo: Blucher, p. 113-139, 2010.
- NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. In: HUI, Y. H. **Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology**, CRC Press, p. 209-235, 2012.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**. V. 18, p. 303-319, 2000.
- PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación com alginato em alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012
- PEREIRA, L. B.; SIMIONI, F. J.; CARIO, S. A. F. Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: novas estratégias em busca da competitividade. **XLIV congresso da sober**. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, Fortaleza, 2006.
- PIETROWSKI, G. A. M., SANTOS, C. E., SAUER, E., WOSIACKI, G., Nogueira, A. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.9815-9821, 2012.
- PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48 (8), p.3396-3402, 2000.
- QIN, Y. The preparation and characterization of fiber reinforced alginate hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 2756-2761, 2008.
- RIBÈREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of enology** vol.1 The Microbiology of Wine and Vinifications. 2. ed, England: John Wiley & Sons Ltd. p. 497, 2006.
- RIET, K. V.; TRAMPER, J. **Basic Biorreactor Design**. Marcel Dekker, 465 p. Nova Iorque, Estados Unidos da América, 1991.
- ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. Tese de doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil, 2006.
- SALVADÒ, Z., ARROYO-LÓPEZ, F. N., BARRIO, E., QUEROL, A., GUILLAMÓN, J. M. Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**. v.80, p.1155-1161, 2011.

- SANTOS, C. M. E.; PIETROWSKI, G. A. M.; BRAGA, C. M.; MEDEIROS, A.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Characterization of aroma compounds in Gala Apple cider obtained by different commercial yeasts. 2012. (submetido)
- SATORA, P.; SROKA, P.; DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T.; TUSZYNSKI, T. The profile of volatile compounds and polyphenols in wines produced from dessert varieties of apples. **Food Chemistry**, v. 111, p. 513-519, 2008.
- SILVA, N. C. C. **Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições de desalcoolização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2004.
- SINGLETON, V., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16 (3), p.144-158, 1965.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **The journal of Biological Chemistry**, v.1 (160), p.61-68, 1945.
- TANAKA, H.; IRIE, S.; OCHI, H. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 3, p. 216-219, 1989.
- TATARIDIS, P.; NTAGAS, P.; VOULGARIS, I.; NERANTZIS, E. T. Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation. **E-journal of Science & Technology**, v.1, p. 1-21, 2005.
- THIEMANN, J. E. Construção de equipamentos de fermentação. In: SCHMIDELL et al. **Biotecnologia industrial**: Engenharia Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2007. Cap. 20, p. 441-491
- TORIJA, M. J, ROZES, N., POBLET, M., GUILLAMON, J. M., MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. v.80, p.47-53, 2003.
- WEN-TAO, Q.; WEI-TING, Y.; YU-BING, X.; XIAOJUN, M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsule. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 151-157, 2005.
- WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A., CHIQUETTO, N. C., DENARDI, F., VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.50, p.100-110, 2008.
- YAMAGIWA, K.; SHIMIZU, Y.; KOZAWA, T.; ONODERA, M.; OHKAWA, A. Formation of calcium-alginate gel coating on biocatalyst

immobilization carrier. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 25, n. 06, p. 723-728, 1992.

YU, A-M., XU, Y., WANG, D., WANG, L-P., LIU, Y-M., FEI, X-W. Analysis of influence on different raw materials on volatile aroma compounds of ciders. **Scientia Agricultura Sinica**, v.39 (4), p.786-791, 2006.