

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

JESSICA APARECIDA DE BRITO

**ANÁLISE DO USO DE LEVEDURAS IMOBILIZADAS EM GEL DE ALGINATO DE
CÁLCIO EM SUCESSIVAS FERMENTAÇÕES DO SUCO DE MAÇÃ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2019

JESSICA APARECIDA DE BRITO

**ANÁLISE DO USO DE LEVEDURAS IMOBILIZADAS EM GEL DE ALGINATO DE
CÁLCIO EM SUCESSIVAS FERMENTAÇÕES DO SUCO DE MAÇÃ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo, do Departamento Acadêmico de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sabrina Ávila Rodrigues

PONTA GROSSA

2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa

Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Tecnologia em Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DO USO DE LEVEDURAS IMOBILIZADAS EM DE GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO EM SUCESSIVAS FERMENTAÇÕES DO SUCO DE MAÇÃ

por

JESSICA APARECIDA DE BRITO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 19 de novembro de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^ª. Dra. Sabrina Avila Rodrigues
Prof.^ª Orientadora

Prof^º. Me. Luis Alberto Chavez Ayala
Membro titular

Maria Luísa Cerri
Tecnóloga em Alimentos
Mestranda em Biotecnologia

RESUMO

BRITO, Jessica Aparecida de. **Análise do uso de leveduras imobilizadas em gel de alginato de cálcio em sucessivas fermentações do suco de maçã.** 2019. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

Uma das vantagens da utilização de células imobilizadas em processos fermentativos é a facilidade no processo de separação da célula em um meio de cultivo. No procedimento para a imobilização celular, utiliza-se amplamente o composto químico alginato de cálcio. Estudos nesta área têm demonstrado que células imobilizadas apresentam maior resistência a variações de temperatura, concentração de substratos e metabólitos, além de um alto rendimento para fermentação alcoólica. Este trabalho de conclusão de curso apresenta como proposta analisar o uso e o reaproveitamento das leveduras em cápsulas de gel de alginato de cálcio em sucessivas fermentações do suco de maçã. Estudos de fermentação em regime batelada foram conduzidos para avaliar o consumo de substratos, a viabilidade celular, a turbidez e a qualidade do mosto fermentado. Foram realizadas análises físico-químicas dos mostos e os fermentados de maçã (sidra), como pH, sólidos solúveis (°Bx) e turbidez. A imobilização celular em esferas de alginato de cálcio permitiu a reutilização das esferas durante dez ciclos de fermentação de 168 horas cada. Os resultados indicam a imobilização celular em esferas de alginato de cálcio como uma técnica promissora para a área de tecnologia de bebidas.

Palavras-chave: Imobilização celular. *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação alcoólica. Alginato de cálcio.

ABSTRACT

BRITO, Jessica Aparecida de. **Analysis of the use of immobilized yeast in calcium alginate gel in successive fermentations of apple juice.** 2019. 35 f. Work of Conclusion Course (Graduation in Food Science and Technology) – Federal University of Technology - Paraná. Ponta Grossa, 2019.

One of the advantages of using immobilized cells on fermentative processes is the easy cell separation process in a culture media. Calcium alginate is used extensively in the procedure for cell immobilization. Studies have shown that immobilized cells have better resistance to the temperature variation, substrates and metabolites concentration, and high efficiency for alcoholic fermentation. This final course assignment presents a proposal analyze the use and reuse of yeasts present in calcium alginate beads in successive fermentations of apple juice. Batch fermentation studies were conducted to measure the substrates consumption, cell viability, turbidity and the quality of the fermented mash. Physicochemical analysis of the mashes and the fermented of apple (cider) were carried out, measuring pH, soluble solids (°Bx) and turbidity. The cell immobilization in calcium alginate beads has enabled the beads reuse for ten cycles of fermentation, lasting 168 each one. The results indicate that cell immobilization in calcium alginate beads as a promising technique for beverage technology.

Keywords: Cell immobilization. *Saccharomyces cerevisiae*. Alcoholic fermentation. Calcium alginate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação das tecnologias de imobilização	17
Figura 2 - Estrutura Química do Gel de Alginato de Cálcio	20
Figura 3 - Estequiometria da Fermentação alcoólica	21
Figura 4 – Fermentação do suco de maçã	25
Gráfico 1 - Sólidos solúveis durante os dez ciclos de fermentação	28
Gráfico 2- Médias dos sólidos solúveis durante os dez ciclos de fermentação	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sólidos solúveis durante os processos fermentativos	27
Tabela 2: Características físico-químicas das amostras após tempo de maturação.	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.1.1 Objetivos específicos	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 IMOBILIZAÇÃO CELULAR	16
2.1.1 Vantagens e desvantagens	18
2.1.2 Aplicação	19
2.1.3 O alginato	19
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	21
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3 FERMENTADO DE MAÇÃ - SIDRA.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 MICRORGANISMO E A ENCAPSULAÇÃO EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO	24
3.2 PREPARO DO FERMENTADO DE MAÇÃ.....	24
3.3 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS	26
3.3.1 Sólidos Solúveis.....	26
3.3.2 Turbidez.....	26
3.3.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1 CONSUMO DO SUBSTRATO	27
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA BEBIDA FERMENTADA	29
4.3 VIABILIDADE CELULAR	30
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A encapsulação celular é um termo que descreve as muitas formas em que as células podem ser immobilizadas ou aprisionadas (BOFO et al, 2005). A célula que, por meios naturais ou artificiais é impedida de se mover, independente do que está ao seu redor, para a fase aquosa, é uma célula immobilizada. (TAMPION, 1988).

A técnica de encapsulação celular segundo Vieira (2018), é simples, barata e atóxica, ou seja, não contamina o meio a ser fermentado, aprisiona as células utilizadas e transfere os nutrientes e metabólitos. (VIEIRA, 2018).

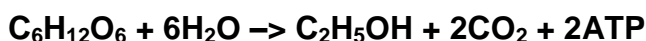
O uso de imobilização celular de leveduras em processos fermentativos apesar de conhecido há muito tempo é pouco aplicado em processos industriais. Existem vantagens conhecidas da encapsulação, como a reutilização das mesmas para outras operações.

Uma das principais dúvidas está acerca do número de ciclos fermentativos no qual as leveduras apresentam viabilidade celular quando immobilizadas.

Há vários trabalhos relacionados à encapsulação de leveduras para fermentação alcoólica, como o artigo “Imobilização celular de leveduras para aplicação na fermentação alcoólica”. (VIEIRA, 2018). Contudo, é necessário verificar o número de ciclos da fermentação utilizando as cápsulas continuamente.

Atualmente, há estudos que avaliam distintos suportes para armazenar as células immobilizadas, com a finalidade de proteger e aumentar a produção dos fermentados. (ORTIZ, 2017).

A fermentação alcoólica é uma via anaeróbia realizada por leveduras, em que os açúcares simples são convertidos em etanol e dióxido de carbono, como mostra a reação seguinte:



Os aspectos para a fermentação alcoólica alcançados com células de *Saccharomyces cerevisiae* immobilizadas proporcionaram maior rentabilidade na fabricação de álcool etílico, quando confrontados ao procedimento com células livres. (DUARTE, 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é abundantemente utilizada no processo de fermentação de açúcares, devido ao fato de transformar o açúcar em álcool de maneira rápida e com uma baixa produção de elementos secundários. (HEINZ, 2014).

Segundo o Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, do Congresso Nacional, regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas:

Art. 44. Fermentado de fruta é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura de uma única espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá nestes casos, ser adicionado de água. (BRASIL, 2009).

O fermentado de fruta é uma boa opção para o processamento industrial ou artesanal desta, conservando as suas características e acrescentando valor ao produto obtido. Estas bebidas alcoólicas proporcionam um sabor que agrada os apreciadores, até mesmo os mais refinados. Mantendo as propriedades da fruta e agregando valor ao produto final. (HEINZ, 2014).

O beneficiamento de maçãs pelo Brasil, tendo em vista a preparação de diferentes produtos, como sucos e fermentados, ainda é muito pequeno em relação a outros países. Na safra 2015/2016, o uso para o processamento correspondeu somente a 2,5% da produção de maçã no Brasil. Por outro lado, a média mundial é de 14,1%, isso é quase seis vezes maior que a porcentagem nacional. (LAZZAROTTO, 2016).

Para restabelecer e expandir o comércio do fermentado de maçã, é indispensável melhorar a qualidade da bebida produzida. Uma opção que também é determinante para melhorar as características finais consiste na escolha da espécie de levedura usada para realizar a fermentação da fruta. (SOUZA, 2011).

O presente trabalho abordará o reaproveitamento das cápsulas de alginato de cálcio com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que serão usadas para realizar a fermentação do suco de maçã integral. Em seguida, serão realizadas as análises de turbidez, cor e teor alcoólico da bebida obtida.

1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o uso e o reaproveitamento das leveduras em cápsulas de gel de alginato de cálcio em sucessivas fermentações do suco de maçã.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o número de ciclos no qual as leveduras apresentam viabilidade celular;
- Avaliar o consumo do substrato ao longo dos ciclos de fermentação;
- Avaliar a turbidez do mosto ao longo dos ciclos de fermentação;
- Avaliar a qualidade final dos fermentados obtidos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

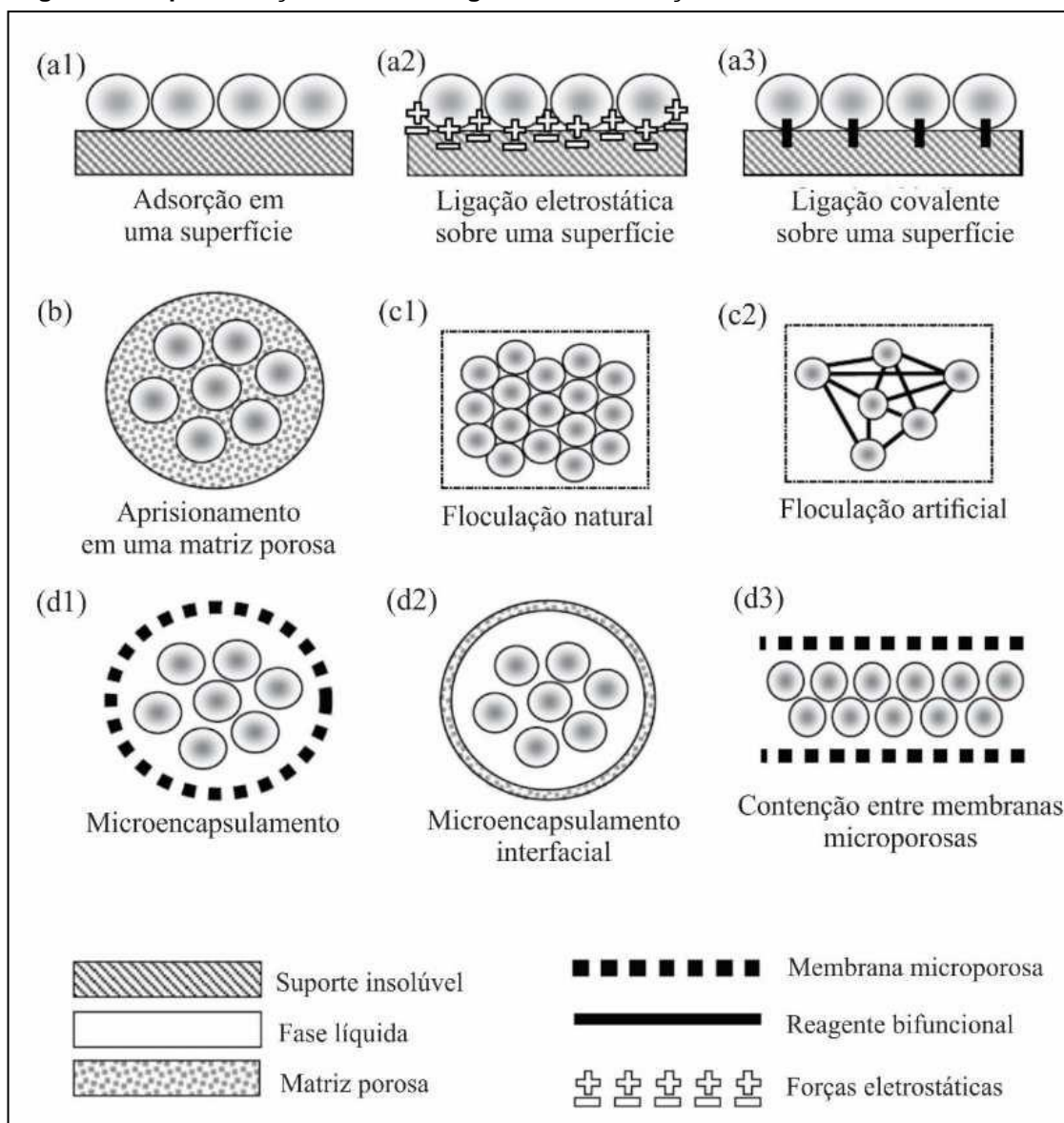
Segundo Bassani (2018), a encapsulação determina-se como um artifício de aprisionamento de uma substância (agente ativo) em outro conteúdo (material de parede), isto impede o movimento da célula para a fase aquosa em estudo. A substância encapsulada é usualmente denominada de fase núcleo e a substância que está imobilizando é comumente chamada de revestimento, membrana, cápsula, material de suporte, fase externa ou matriz

No local onde as células intactas estão confinadas ocorre a preservação de sua atividade catalítica, isto possibilita a reutilização da mesma. (ORTIZ, 2017).

A imobilização celular usada no processo fermentativo tem sido desenvolvida para acabar com a inibição ocasionada pela elevada concentração de substrato e produto, ao mesmo tempo para aumentar a produtividade e a rentabilidade da produção de etanol. (DUARTE, 2011).

Os tipos de imobilização podem ser distribuídos em quatro categorias que são diferenciadas pelo mecanismo físico empregado. Exemplificado na Figura 1, a representação das tecnologias de imobilização, que são: (a) fixação ou adsorção na superfície de um suporte sólido; (b) retenção a partir do aprisionamento em uma matriz porosa; (c) auto agregação pela floculação natural ou por ligações cruzadas que são induzidas artificialmente; e (d) contenção de células por diversos tipos de barreiras. (ORTIZ, 2017).

Figura 1 - Representação das tecnologias de imobilização



Fonte: Ortiz (2017)

O método de aprisionamento em matriz é baseado na difusão celular em uma matriz porosa, pode ser pré-formada ou sintetizada *in situ* em torno das células, estas são dispostas dentro de uma malha rígida que impede a difusão das células para o meio. (ORTIZ, 2017).

Segundo Bassani (2018), esse procedimento vem sendo amplamente analisado para imobilizar células viáveis, pois conserva a integridade celular, uma vez que, permite o emprego de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suporte de retenção.

O encapsulamento das células em géis de polissacarídeos, como alginatos, pectinas, ágar e quitosana são exemplos deste tipo de método. Estes materiais possuem as vantagens de serem atóxicos, biocompatíveis e de baixo custo. O desenvolvimento na matriz porosa depende dos obstáculos de difusão imposto pela porosidade do material. (ORTIZ, 2017; BATISTA, 2005; BASSANI, 2018).

O aprisionamento em gel pode ser feito pelo método de extrusão, este método produz uma pequena gotícula da solução do material de encapsulamento forçada através de pequenas fissuras em aparelhos geradores de gotas. A dimensão e o formato esférico das gotículas dependem até mesmo, da distância entre o sistema de gotejamento e a superfície da solução gelificante, bem como da viscosidade da solução de alginato, por exemplo. (ORTIZ, 2017; BASSANI, 2018).

A imobilização de células permite o reuso de biomassa, melhora a estabilidade e diminui a contaminação do produto. (BATISTA, 2005).

As cápsulas podem ser identificadas pelo seu tamanho, as macrocápsulas são as maiores que 5000 μm e, as microcápsulas, têm uma variação entre 0,2 e 5000 μm . O tamanho das cápsulas é determinado pelo tipo de material usado para formar a capsula e a técnica usada para realizar a encapsulação. (BASSANI, 2018).

2.1.1 Vantagens e desvantagens

A maior vantagem em optar por utilizar células imobilizadas é a supressão da etapa de separação da biomassa do produto final. (DUARTE, 2011; BASSANI, 2018). Há também o uso como metodologia para o aumento da resistência da levedura durante a fermentação, a alta na produtividade e a elevação da qualidade do fermentado. (BASSANI, 2018).

A imobilização permite a utilização de um sistema contínuo com maior controle sobre a permanência das células dentro do reator. Além do mais, há redução da fase de adaptação (fase “*Lag*”), permitindo um menor tempo de reação. (DUARTE, 2011).

Como desvantagem, a encapsulação pode acarretar mudanças no crescimento celular, na atividade metabólica e nas funções do microrganismo. Não há como identificar quais serão as alterações. O espaço limitante da microencapsulação com o alginato provoca uma alteração entre as *Saccharomyces*

cerevisiae livres e imobilizadas com alginato. Com o aumento de células no interior das esferas, o crescimento das mesmas diminui. (BASSANI, 2018).

2.1.2 Aplicação

É importante fazer uma boa escolha quando se fala em suporte para acomodar as capsulas que serão usadas em um processo de fermentação, isso influencia na atividade metabólica do microrganismo. Além do mais, um suporte deve ser de baixo custo, estável, não tóxico, reutilizável e que permite altas concentrações celulares. (ORTIZ, 2017).

A técnica de encapsulação é amplamente utilizada nas áreas de alimentos, têxtil, agronomia, química e farmacêutica. (BASSANI, 2018). O uso das células imobilizadas na produção de etanol em escala industrial ainda possui limitações. Para que ocorra o aumento desta operação, é necessário o desenvolvimento de metodologias de encapsulamento que sejam mais viáveis economicamente. (ORTIZ, 2017).

De acordo com Ortiz (2017), dos variados tipos de imobilização, o aprisionamento de células em suportes poliméricos (gelatina, agarose, alginato de cálcio, κ -carragena, entre outros), é muito estudado para a produção de bioetanol.

Uma outra opção de matriz para imobilização celular é o Lentikat®, que é uma pastilha de matriz de álcool polivinílico (PVA) que possui alta estabilidade mecânica e elástica. (ORTIZ, 2017).

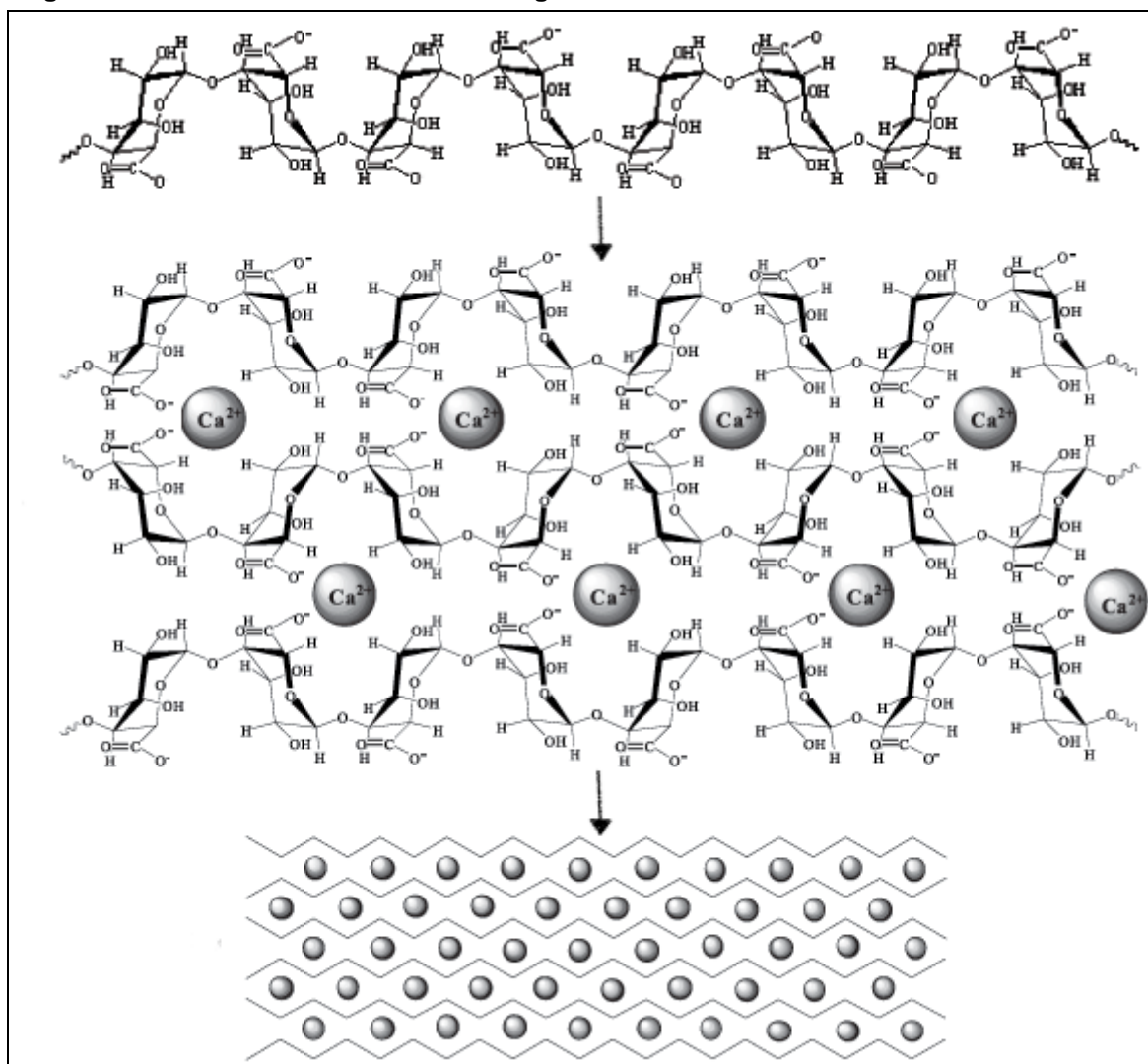
2.1.3 O alginato

O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons, constituído de sais algínicos como o ácido manurônico e gulurônico, podendo variar a sua composição e sequência, dependendo da alga de origem (KOVALESKI, 2009)

Este polissacarídeo possui propriedades que permitem o seu uso como base para liberar e/ou aprisionar uma diversidade de proteínas e células. Pode-se citar algumas destas propriedades, como por exemplo, um ambiente aquoso inerte no interior da base; a encapsulação em temperatura ambiente sem necessidade de solventes; a habilidade gelificante; entre outras. (DUARTE, 2011).

O alginato de sódio é solúvel em água e se torna insolúvel na presença de cátions bivalentes, como Ca^{++} ou Mg^{++} , por isso o gotejamento em cloreto de cálcio (CaCl_2) para o processo de encapsulação celular. A Figura 2 apresenta como ocorre a formação do gel de alginato de cálcio. (ORTIZ, 2017; DUARTE, 2011).

Figura 2 - Estrutura Química do Gel de Alginato de Cálcio



Fonte: Kovalski (2019)

A maior vantagem em realizar uma fermentação com a *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio, deve-se ao fato de que as células estão fisicamente aprisionadas dentro de uma matriz e assim possuem melhor retenção e uma grande área superficial para uma operação eficiente. (BATISTA, 2005; SAVI, 2014).

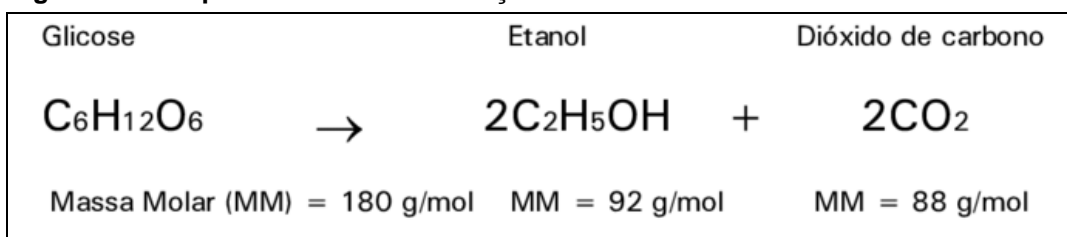
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica se desenvolve em anaerobiose, através da modificação dos açúcares em etanol e CO₂ alimentados por enzimas, produzidas na maioria das vezes por leveduras, com o intuito de gerar energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas. (HEINZ, 2014).

Os principais produtos da fermentação são o etanol, glicerol, ácido lático e dióxido de carbono, contudo, existe a formação alguns compostos em baixas proporções, resultantes do metabolismo de açúcares e aminoácidos. (SANTOS, 2014).

A Figura 3, apresenta a estequiometria da transformação de açúcares (C₆H₁₂O₆), em etanol (C₂H₆O) e gás carbônico (CO₂).

Figura 3 - Estequiometria da Fermentação alcoólica



Fonte: Batista (2017)

As leveduras são os microrganismos mais importantes na fermentação alcoólica e, o gênero *Saccharomyces* é um dos grupos mais estudados. (BATISTA, 2017).

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A Levedura *Saccharomyces cerevisiae* é abundantemente usada no processo de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas. (SALLES, 2015). Sua aplicação é imensa, podendo ser utilizada na produção de pães, cervejas e vinhos, em rações animais, probióticos para animais e humanos, biocatalizadores em química orgânica, suplementos alimentares, aromatizantes, entre outros. (KOVALESKI, 2019).

É grande fonte de interesse da indústria e de pesquisas, pois dispõe de alta eficiência de fermentação, possui uma tolerância ao etanol, à diferenças de

temperatura, às altas concentrações de açúcares e pode produzir metabólitos anticontaminantes. (SALLES, 2015).

2.3 FERMENTADO DE MAÇÃ - SIDRA

Segundo Girardi (2011), o consumo mundial de sidra situa-se próximo dos 15 milhões de hectolitros, sendo que a União Européia consome mais de 80% desse volume. A Inglaterra é o país de maior consumo (800 milhões de litros), seguida de longe pela África do Sul (120 milhões de litros), França (100 milhões de litros), Espanha (80 milhões de litros) e Irlanda (70 milhões de litros). Os demais 20% da produção mundial são consumidos por países com herança Anglo-Saxônica (EUA, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia), Espanhola (Argentina e México) e também o Canadá.

No Brasil, o volume produzido é relativamente pequeno, sendo esta bebida normalmente consumida no Natal e em festas de final de ano. (GIRARDI, 2011). Além de tudo, a sidra nacional, em geral, possui problemas qualitativos, que acontecem devido ao emprego de matéria-prima de baixa qualidade e de deficiências tecnológicas pertinentes observadas nas etapas de processamento da fruta. (LAZZAROTTO, 2012).

No que se refere ao fermentado de maçã e a sidra, para melhorar o mercado brasileiro desta bebida, é necessário a melhoria de suas características. O tipo de levedura utilizada é um fator determinante do melhoramento do sabor, odor, entre outras características. (SOUZA, 2011).

O Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, do Congresso Nacional, regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas:

Art. 47. 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. § 1º A Sidra poderá ser gaseificada, sendo proibida a denominação sidra-champanha, espumante ou expressão semelhante. [...] § 3º A Sidra pode ser adicionada de açúcares, somente para adoçamento, e de outros aditivos. (BRASIL, 2009).

De acordo com Girardi (2011), a sidra é uma das bebidas alcoólicas mais antigas. Os hebreus a chamavam *Shekar*, os gregos *Sikera* e os romanos *Sicera*. Esta bebida pode apresentar propriedades que trazem benefícios à saúde, pois possui os nutrientes da maçã como minerais, polifenóis, vitaminas, ácidos essenciais, enzimas e pectinas, desde que consumida com moderação. (GIRARDI, 2011).

Dentre os maiores produtores do fermentado estão, a Inglaterra, a França e a Espanha, Irlanda, Finlândia, Suécia, Grécia, Bélgica, Dinamarca e Alemanha. No Brasil, a bebida fermentada é culturalmente consumida no Natal e Ano-Novo. O brasileiro não tem como hábito o consumo rotineiro, toda a produção é direcionada ao mercado interno. (GIRARDI, 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO E A ENCAPSULAÇÃO EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

De acordo com a metodologia realizada por Kovaleski (2019), a composição para a posterior formação das cápsulas possui 100 ml de suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de sacarose), com 100 ml de solução de alginato de sódio 6% cuja concentração final será equivalente a 3%. Goteja-se a mistura em solução de cloreto de cálcio (3%) sob agitação para formação das esferas. A concentração inicial de leveduras inoculadas corresponde a 10^7 UFC L⁻¹.

O procedimento elaborado por Kovaleski (2019), utilizou-se das cápsulas formadas em um primeiro processo de fermentação alcoólica para obtenção de sidra. Após o processo fermentativo, as cápsulas elaboradas por Kovaleski (2019), foram armazenadas em água destilada estéril, em frasco de vidro fechado por 60 dias e então estas cápsulas foram aplicadas no presente estudo.

3.2 PREPARO DO FERMENTADO DE MAÇÃ

O suco de maçã utilizado foi adquirido no mercado local, o mesmo é pasteurizado e comercializado em garrafas de Poli(Tereftalato de Etileno) lacradas, de 1,35 litros. Todas as embalagens separadas para o experimento eram do mesmo lote (L909 H08:51) e com um prazo de validade até 06/10/2019, permite-se assim o uso até o final das análises previstas.

Realizaram-se as fermentações nas próprias garrafas comerciais, com alteração na tampa para que haja a troca gasosa estéril, com a utilização de uma válvula do tipo *Air Lock* de troca gasosa inserido em um furo no meio da tampa.

Inicia-se o estudo com os experimentos divididos em dez ciclos consecutivos de fermentação alcoólica em anaerobiose à 21°C, Utiliza-se um litro (1L) de suco de maçã comercial integral sem adição de conservantes, aplica-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio.

Cada ciclo teve duração de uma semana. Inocula-se as cápsulas no suco de maçã com o auxílio de um suporte flexível com altura de 240 mm, largura de 30 mm e com perfurações de 1,26 milímetros (mm). Dispõe-se o suporte verticalmente dentro do recipiente de fermentação que se apresenta com 268 mm de altura, e 31,3 mm de diâmetro em seu gargalo. Com isso, admite-se a transferência das leveduras para utilização nas outras fermentações programadas. No final do ciclo de fermentação, retira-se as leveduras imobilizadas do recipiente e inocula-se em um novo frasco contendo suco de maçã para início de um novo ciclo fermentativo.

A Figura 4 apresenta a garrafa pronta para o processo de fermentação, com o trocador de gases e as leveduras encapsuladas no suporte.

Figura 4 – Fermentação do suco de maçã



Fonte: Autoria própria

Logo após, aloca-se o fermentado em uma incubadora à 5°C durante 21 dias para maturação e decantação. Após este período, transfere-se o fermentado para garrafas de vidro higienizadas, adiciona-se 6 g.L-1 de açúcar (sacarose) para a gaseificação do produto na garrafa fechada. No final do ciclo de fermentação determina-se a turbidez, o teor de sólidos solúveis e o pH da sidra.

3.3 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS

3.3.1 Sólidos Solúveis

Mede-se a quantidade de sólidos solúveis, também conhecido Brix, nos cinco primeiros dias e também no final da fermentação. Com bastão de vidro estéril, retira-se de uma a duas gotas do mosto com cuidado ao abrir a garrafa a fim de evitar contaminações cruzadas. Deposita-se as gotas no refratômetro e realiza-se a leitura do Brix.

3.3.2 Turbidez

De acordo com o método de Kovaleski (2019), quantifica-se a turbidez do meio de fermentação em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez), utiliza-se o Turbidímetro PoliControl AP2000 WT. Calibra-se o turbidímetro com os padrões de 0,10 NTU, 20 NTU, 100 NTU e 800 NTU.

Adiciona-se 20 ml de amostra do suco, e logo após da sidra, na cubeta do equipamento e verifica-se as leituras.

3.3.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

As medidas do pH foram obtidas em um pHmetro digital de bancada, previamente calibrado com soluções padrões de 4,0 e 7,0. Adiciona-se a amostra de suco e logo depois dos fermentados de maçã em um Becker de 50 ml, e submerge-se o eletrodo para a leitura das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONSUMO DO SUBSTRATO

Durante o processo de fermentação alcoólica o mosto sofre grandes transformações bioquímicas fundamentais para obtenção de um fermentado de qualidade. As leveduras utilizam prontamente os açúcares utilizados como substrato na produção de álcool, ocasionando assim uma diminuição gradual no teor de sólidos solúveis. (MILESKI, 2016; SAVI 2014).

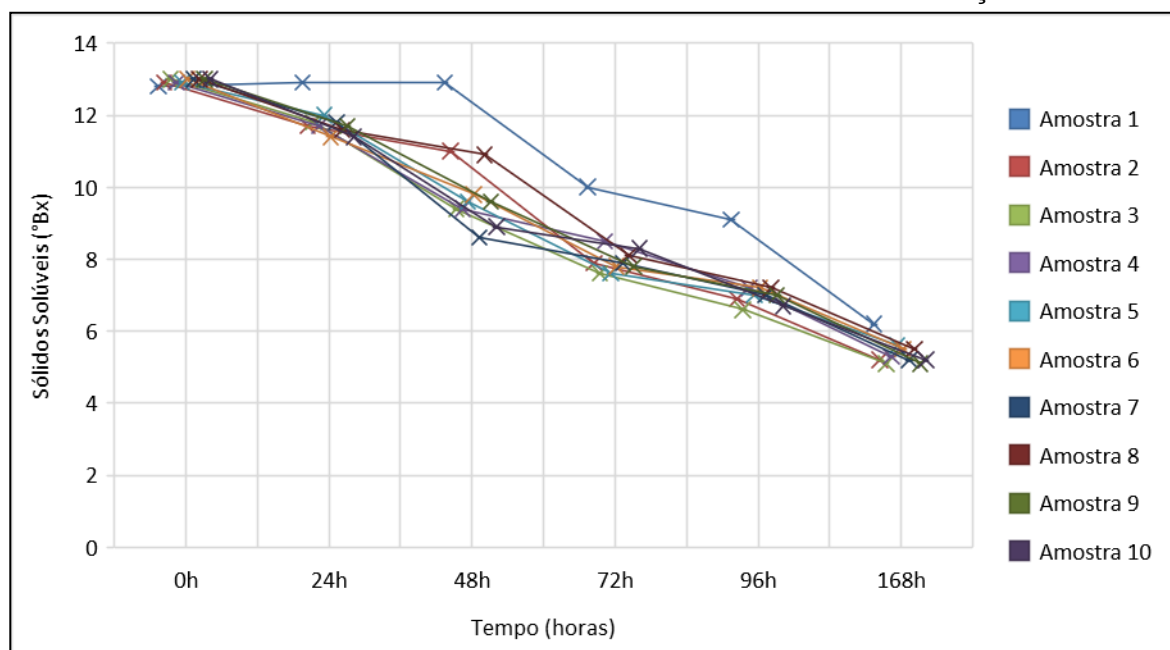
O processo finalizou-se logo após as 168 horas de fermentação. O conteúdo de sólidos solúveis durante os ciclos foram aproximados (Gráfico 1), desconsiderando a primeira amostra, onde o microrganismo estava se adaptando ao meio. Os dados sobre o valor de Brix coletado em cada amostra estão dispostos na tabela 1:

Tabela 1: Sólidos solúveis durante os processos fermentativos

Amostras	Sólidos Solúveis (°Bx)						Consumo do	
	Número	0h	24h	48h	72h	96h	168h	Acúcares
								Percentual (%)
1	12,8	12,9	12,9	10,0	9,1	6,2		51,6
2	12,9	11,7	11	7,9	6,9	5,2		59,7
3	13	11,8	9,4	7,6	6,6	5,1		60,8
4	12,9	11,7	9,4	8,5	7,2	5,3		58,9
5	12,9	12	9,6	7,6	7	5,6		56,6
6	13	11,4	9,8	7,8	7,2	5,5		57,7
7	13	11,8	8,6	7,9	7	5,2		60,0
8	13	11,6	10,9	8,1	7,2	5,5		57,7
9	13	11,7	9,6	7,8	7	5,1		60,8
10	13	11,4	8,9	8,3	6,7	5,2		60,0

Fonte: Autoria Própria

Gráfico 1 - Sólidos solúveis durante os dez ciclos de fermentação



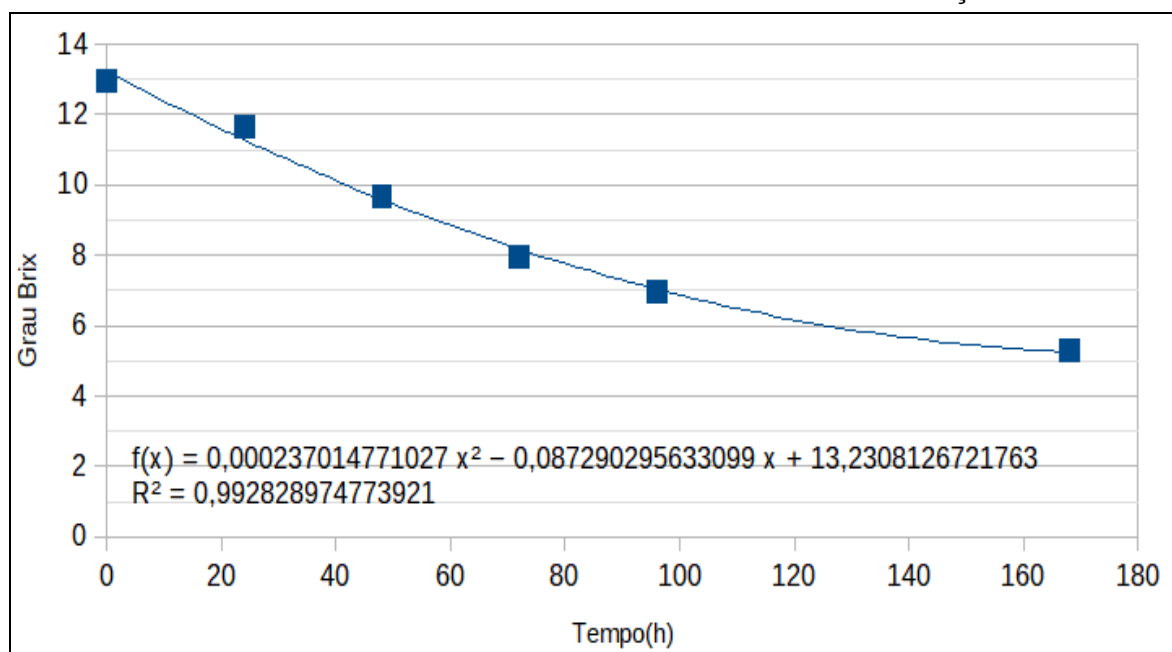
Fonte: Autoria própria

A amostra 1, em azul no Gráfico 1, tem o comportamento diferente das demais, possivelmente porque foi a primeira e as células demoraram um pouco para se adaptar ao meio, visto que estavam mantidas em refrigeração por um longo período. Isso se explica, quando analisamos a curva de crescimento dos microrganismos, a primeira amostra estava na fase “Lag”, é o momento de adaptação ao meio onde o microrganismo foi inoculado.

Segundo Gava (2008), considera-se que o 1°Bx fornece 0,5°GL de álcool. Graus Gay Lussac (GL) é uma porcentagem volume/volume de álcool etílico. Considerando a média dos sólidos solúveis de todas as amostras no tempo 0h como 13°Bx e no tempo 168h como 5°Bx, o valor de álcool etílico é de 4% (v/v). De acordo com Savi (2014), no Brasil, sidra é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 8% (V/V) a 20 °C. Pode-se concluir que a bebida fermentada elaborada atingiu a graduação alcoólica mínima. Mudanças na quantidade inicial de sólidos solúveis, no tempo de fermentação, maturação e temperatura podem influenciar na quantidade final de álcool etílico.

Pode-se produzir uma curva com a média das nove amostras que possuem uma disposição comum, como mostra o Gráfico 2:

Gráfico 2- Médias dos sólidos solúveis durante os dez ciclos de fermentação



Fonte: Barreto, Rodrigues, Brito (2019)

Essa curva pode prever para esse experimento, o tempo necessário para atingir determinado Brix. Utiliza-se a equação (1):

$$\text{Sólidos solúveis (°Bx)} = 0,0002370148x^2 - 0,0872902956x + 13,2308126722 \quad (1)$$

Com $x = 168$ horas, tempo final dos processos fermentativos, o Brix é igual a $5,25^\circ\text{Bx}$. A amostra 1 não foi incluída na curva, pois era uma amostra de adaptação ao meio. Avaliou-se que a microencapsulação foi bem realizada, devido ao fato de a levedura ter apresentado o mesmo padrão até o fim do experimento sem ocorrer o aparentemente rompimento das cápsulas.

4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA BEBIDA FERMENTADA

Analisou-se o valor inicial de turbidez e pH, chegando a um valor de 442 NTU e 4,23, respectivamente. Logo após o processo de maturação da bebida fermentada, verificou-se os valores de pH, turbidez e Brix de cada amostra (Tabela 2). Os valores de pH e sólidos solúveis foram semelhantes, comparando todos os dez ciclos, contudo, a turbidez variou de 199 NTU na amostra 1, para 58 NTU na fermentação 10.

A turbidez ideal para a sidra é de 0-50 NTU, sendo 50 NTU um líquido ligeiramente turvo e 10 NTU um líquido límpido. (KOVALESKI, 2019). A presença de sólidos suspensos promove o aumento de turbidez. Para que ocorra a diminuição das impurezas e conseqüentemente da turbidez é feito o processo de clarificação do fermentado de maçã. Assim, a bebida alcança uma turvação ideal para manter a aparência ideal para o gosto do consumidor.

É possível afirmar que quanto mais ciclos de fermentações realizadas menor é a turbidez da amostra, pois segundo a curva de crescimento dos microrganismos, existe a fase de latência onde a *Saccharomyces cerevisiae* está se adaptando ao meio, no caso o suco de maçã. Pode ocorrer crescimento e há também uma diminuição do número de microrganismos. (GAVA, 2008). Com isso, pode-se concluir que na amostra 1 (Tabela 2) houve uma adaptação, uma grande multiplicação das leveduras e também um grande decréscimo, resultando numa quantidade maior de biomassa e conseqüentemente uma turbidez elevada em relação as amostras posteriores, que possuiriam um número menor de leveduras com a sucessão dos ciclos de fermentação.

Tabela 2: Características físico-químicas das amostras após tempo de maturação

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	4,02	4,02	3,99	4,0	4,0	4,03	4,04	4,04	4,04	3,99
Sólidos solúveis (°Bx)	5,7	5,2	5,1	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,5	5,3
Turbidez (NTU)	199	113	95	92	87	84	77	85	54	58

Fonte: Autoria própria

Verificou-se a precipitação do material suspenso nas amostras 2 e 5 após o tempo de maturação da bebida, como não houve o rompimento físico das capsulas, pode concluir que o esta matéria é biomassa celular.

4.3 VIABILIDADE CELULAR

A encapsulação exige um procedimento brando, a fim de preservar a atividade e viabilidade celular dos microrganismos, para que a fermentação seja efetiva. A gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de íons cálcio sem

grandes variações de temperatura, pH e pressão osmótica, isso preserva a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados. (BATISTA et al., 1999).

De acordo com a variação dos sólidos solúveis do mosto ao longo de todo o procedimento (Tabela 1), e principalmente comparando as amostras no último dia de fermentação, é possível concluir que existe viabilidade celular durante os 10 ciclos que foram previamente planejados. Ferrandin (2014), avaliou a fermentação alcoólica do bagaço de maçã e após 132 h de fermentação o conteúdo de sólidos solúveis verificado foi de 5,5°Bx, este valor é próximo dos resultados analisados nesta pesquisa.

Pode-se afirmar que as leveduras se mantiveram viáveis durante os dez ciclos. Houve uma redução de biomassa num ritmo constante, e conseqüentemente o declínio na concentração de microrganismos, entretanto, como houve fermentações similares (Tabela 1 e 2), significa que a viabilidade celular se conservou.

Recomenda-se analisar mais fermentações para verificar até quantos ciclos a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta viabilidade nas cápsulas de alginato de cálcio, até haver menos consumo dos sólidos solúveis na amostra.

Apesar da perda de biomassa, a concentração inicial de 1×10^7 células/ml de leveduras foi satisfatória para realizar as fermentações programadas.

5. CONCLUSÃO

O processo fermentativo usando a imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio com as concentrações do alginato de sódio, cloreto de cálcio e a concentração inicial da *Saccharomyces cerevisiae* (3%, 3% e 1×10^7 células/ml), realizado nesta pesquisa é promissora. A imobilização permitiu o reuso das microcápsulas durante os 10 ciclos de fermentação. O suporte elaborado para fazer a transferência das esferas de uma amostra para a seguinte, foi vantajoso. Esta é uma importante eficiência do experimento, pois além de se utilizar as mesmas esferas, permite uma fácil separação do meio líquido.

De acordo com o objetivo geral e nos objetivos específicos determinados neste projeto, pode-se concluir que o mesmo foi realizado, pois cumpriu todos os objetivos propostos e apresenta resultados e conclusões de importância científica para contribuir positivamente com a comunidade acadêmica. Os dados obtidos são promissores, incentivando a continuidade deste trabalho e servindo de base para futuras pesquisas.

Como proposta para futuros estudos, pode-se citar: estudar a cinética da fermentação das melhores condições definidas neste trabalho visando a redução do tempo de cada ciclo; avaliar se é possível manter a integridade das esferas por mais ciclos de reutilização; avaliar a produtividade da fermentação e a integridade das esferas operando em modo contínuo; desenvolver um procedimento para quantificação das leveduras dentro das esferas de alginato de cálcio.

6. REFERÊNCIAS

BARRETO, Marcelo Ferreira; RODRIGUES, Sabrina Ávila; BRITO, Jessica Aparecida de. Fermentação de suco de maçã com microcápsulas de levedura. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 24, 2019, Ponta Grossa. **Documento avaliado pelos pares**. Pato Branco: Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da Utfpr, 2019.

BASSANI, J. C. **Imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio e avaliação da viabilidade celular e estabilidade bioquímica em diferentes condições de armazenamento**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

BATISTA, A. C. **Avaliação das características tecnológicas de hidromel tipo melomel produzido com diferentes cepas de *Saccharomyces Cerevisiae***. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017.

BATISTA, M. A. **Estudo de imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

BATISTA, M. A, CARVALHO, W., SILVA, S.S. Imobilização de células de *Candida guilliermondii* em gel de alginato de cálcio: Efeito do tempo de cura na viabilidade celular. In: Simpósio de Iniciação Científica, 3, 1999, Marília, Brasil. **Anais...** Marília: UNIMAR – Universidade de Marília, 1999. P.150.

BOFO, D.C.S; CASTRO; H.F.; MEDEIROS, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (OSMOTOLERANTES) E *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Foods Technology**, São Paulo, mar. 2005.

BRASIL. **Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1265102>> Acesso em: 15 mar. 2019.

DUARTE, C. D. **Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes no processo de fermentação alcoólica**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

FERRANDIN, Giulia. **Avaliação do potencial antioxidante e produção de fermentado alcoólico a partir do bagaço da maçã**. 2014. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GIRARDI, César Luís; ZANUS, Mauro Celso. **Sidra - Alternativa para a diversificação e agregação de valor na cadeia produtiva da maçã no Brasil**. 107. ed. Bento Gonçalves: Embrapa, 2011. 4 f.

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

KOVALESKI, Gabriela. **Estudo da Imobilização Celular de *Saccharomyces cerevisiae* em Alginato de Cálcio**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

LAZZAROTTO, Joelsio José et al. **Parâmetros para investimentos na produção de suco integral de maçã com alto padrão tecnológico**. 133. ed. Bento Gonçalves: Embrapa, 2016. 17 p.

LAZZAROTTO, Joelsio José et al. **Sidra com padrão tecnológico diferenciado: uma avaliação junto ao setor produtivo da maçã brasileira**. 91. ed. Bento Gonçalves: Embrapa, 2012. 20 p.

MILESKI, João Paulo Fernando. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces***. 86 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

ORTIZ, S. **Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio com nanopartículas magnéticas**. 2017. 97f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SALLES, Luciane B.; HORST, Guilherme B. **Avaliação da eficiência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (w-34/70) reaproveitada na produção de cerveja**. 2015. 30 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2015.

SANTOS, Tiago Mesquita dos. **Elaboração de cerveja caseira (fermentado alcoólico de lúpulo) e avaliação de alguns parâmetros físico-químicos**. 2014. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2014.

SAVI, Cássia Cristina. **Elaboração de Sidra pelo Método *Champenoise* Utilizando Leveduras Livres e Encapsuladas**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SOUZA, Frederico Koch Fernandes de et al. DESENVOLVIMENTO DE FERMENTADORES EM SÉRIE PARA O ESTUDO CINÉTICO DE FERMENTADO DE MAÇÃ. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.379-386, 5 dez. 2011. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). <http://dx.doi.org/10.3895/s1981-36862011000100001s1>.

TAMPION; J.; TAMPION; M. D. **Immobilized cells: principles and applications**. Cambridge University Press. 1988. 257p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Ra1PZ3_hme4Cpg=PR3&hl=ptBR&source=gs_selected_pa_ges&cad=2#v=onepage&q&f=false> Acesso em: 15 mar. 2019.

VIEIRA, Samuel dos Santos; KOVALESKI, Gabriela; RODRIGUES, Sabrina Ávila. Imobilização celular de leveduras para aplicação na fermentação alcoólica. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 23., 2018, Ponta Grossa. **Documento avaliado pelos pares**. Apucarana: Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da Utfpr, 2018.