

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**GABRIELA KOVALESKI**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *Saccharomyces  
cerevisiae* EM ALGINATO DE CÁLCIO**

**DISSERTAÇÃO**

**PONTA GROSSA  
2019**

**GABRIELA KOVALESKI**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO DE CÁLCIO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Vitoria  
Messias Bittencourt  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sabrina Avila  
Rodrigues

**PONTA GROSSA  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca  
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa  
n.40/2019

K88 Kovalski, Gabriela

Estudo da imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de  
cálcio / Gabriela Kovalski. 2019.

77 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt

Coorientadora: Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

1. Biotecnologia. 2. Fermentação. 3. Leveduras. 4. Cápsulas (Farmácia). I.  
Bittencourt, Juliana Vitoria Messias. II. Rodrigues, Sabrina Ávila. III. Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná. III. Título.

CDD 660.6



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS PONTA GROSSA  
*Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação*  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PPGBIOTEC**  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 3/2019

### ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO DE CÁLCIO

Por

Gabriela Kovaleski

Esta dissertação foi apresentada às **08 horas e 30 minutos** de **26 de abril de 2019** mês, na sala da **DIRPPG**, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Tolentino Marinho**  
(UEPG)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Machado Fidelis do Nascimento**  
(UTFPR)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Ávila Rodrigues**  
(UTFPR)  
*Coorientador(a) e presidente da banca*



Visto da Coordenadora:

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Vitória Messias Bittencourt**  
Coordenadora do PPGBIOTEC  
UTFPR – Câmpus Ponta Grossa

## **AGRADECIMENTOS**

O meu maior agradecimento é aos meus pais, que sempre acreditaram na educação como caminho para um futuro melhor e desde cedo me proporcionaram a melhor formação acadêmica possível. Os únicos que estiveram presentes o tempo inteiro durante a realização desse trabalho.

Em especial agradeço a minha irmã gêmea Anaïs, posso dizer que somos uma pessoa só, você conhece este trabalho do começo ao fim. A minha irmã Fanny, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, obrigada pela sua ajuda e paciência, pois esse trabalho só foi finalizado por sua causa. E ao meu irmão Aurélio, que apesar da distância, ajudou-me a seguir em frente, pensando grande e conquistando todos e tudo pela frente. Os três amores da minha vida.

Obrigada as minhas amigas da faculdade Gabriela, Bertiene e Larissa, que me apoiaram e me acalmavam sempre quando algo de ruim acontecia. Obrigada as minhas amigas (os): Paula, Ana, Camila, Caio, Gabriel, por sempre me escutarem durante esta minha etapa, obrigada pela amizade e companheirismos, estes dois anos foram especiais por todos vocês.

Um agradecimento a minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Sabrina Avila Rodrigues, a qual sempre esteve comigo com muita dedicação e paciência, muito do que está descrito nas seguintes páginas foi devido ao seu empenho também.

## RESUMO

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.

A imobilização celular é um termo que descreve as muitas formas em que as células podem ser encapsuladas ou aprisionadas. Um dos métodos mais utilizados da imobilização celular é a encapsulação em matriz porosa. É baseada na inclusão de células dentro de uma rede/malha rígida impedindo que as células se difundam no meio. Possui vantagens comparada com o sistema convencional, como a alta densidade celular e processos mais rápidos, mas a transferência de massa e os parâmetros ideais são dificuldades encontradas na encapsulação. Neste trabalho foi estudado o processo de imobilização celular de leveduras através da técnica de encapsulação em alginato de cálcio durante a fermentação alcoólica. Para isso, realizou-se 4 etapas: a pré-fermentação, teste experimentais preliminares, experimento e a aplicação da encapsulação. Com os testes preliminares foi possível encontrar 11 variáveis que influenciam na encapsulação, onde 3 delas foram estudadas no experimento: a concentração do alginato de sódio, do cloreto de cálcio e a concentração inicial de leveduras. Nas concentrações de 3% e 4% de alginato de sódio, o pH, °Brix, a turbidez e o diâmetro das esferas foram semelhantes, mas utilizou-se a concentração de 3% nas próximas fermentações para diminuição dos custos. O mesmo foi observado com 3% e 4% de cloreto de cálcio nas análises de etanol e consumo de substrato. Com diferentes concentrações iniciais de levedura ( $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células/mL), verificou-se que com a maior concentração de levedura o processo de fermentação foi mais rápido. O produto selecionado para aplicar essas variáveis foi a sidra. Conseguiu-se obter uma produção de etanol maior na sidra com leveduras imobilizadas que nas leveduras livres, já que nas primeiras leveduras são protegidas do etanol pela matriz. Análises de turbidez e coloração entre as sidras foram relacionadas. Com imagens realizadas pelo MEV, observou-se o crescimento celular nas esferas de alginato de cálcio. Concluem-se que a encapsulação de leveduras com alginato de cálcio possui vantagens como: alta concentração de células e produção de etanol mais rápida, e quando estudada as suas variáveis, é possível reduzir os custos desse método de imobilização.

**Palavras-chave:** Encapsulação. Fermentação alcoólica. Leveduras imobilizadas.

## RÉSUMÉ

Kovaleski, Gabriela. **Étude de l'immobilisation cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'alginate de calcium**. 77 f. Mémoire (Master en Biotechnologie) - Université Technologique Fédérale du Paraná, Ponta Grossa, 2019.

L'immobilisation cellulaire est un terme qui décrit les nombreuses façons dont les cellules peuvent être encapsulées ou piégées. L'une des méthodes d'immobilisation cellulaire la plus utilisée est l'encapsulation dans une matrice poreuse. Elle est basée sur l'inclusion de cellules dans un réseau / maillage rigide les empêchant de se répandre dans le milieu. Elle présente des avantages par rapport au système conventionnel, telle qu'une densité cellulaire élevée et des processus plus rapides mais, le transfert de masse et les paramètres idéaux sont des difficultés rencontrées lors de l'encapsulation. Dans ce travail, le processus d'immobilisation des cellules de levure a été étudié par la technique d'encapsulation d'alginate de calcium au cours de la fermentation alcoolique. Pour cela, quatre étapes ont été effectuées: pré-fermentation, tests expérimentaux préliminaires, expérience et application de l'encapsulation. Avec les tests préliminaires, il a été possible de trouver 11 variables qui influencent l'encapsulation dont 3 ont été étudiées dans l'expérience: la concentration en alginate de sodium et en chlorure de calcium et la concentration initiale en levures. Aux concentrations de 3% et 4% d'alginate de sodium, le pH, le Brix, la turbidité et le diamètre des billes étaient similaires mais, dans le but de réduire les coûts nous avons utilisé la concentration de 3%. La même chose a été observée avec 3% et 4% de chlorure de calcium dans les analyses d'éthanol et la consommation de substrat. Avec différentes concentrations initiales de levure ( $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  et  $1 \times 10^7$  cellules/mL), il a été vérifié qu'avec une concentration plus élevée de levure, le processus de fermentation était plus rapide. Le produit choisi pour appliquer ces variables a été le cidre. Il a été possible d'obtenir une production de cidre plus importante avec les levures immobilisées qu'avec les levures libres, puisque les premières sont protégées de l'éthanol par la matrice. Les analyses de turbidité et de coloration entre les cidres ont été comparées. Une croissance cellulaire a été observée dans les billes d'alginate de calcium grâce à des images réalisées par meb. Nous concluons que l'encapsulation de levures avec de l'alginate de calcium présente des avantages tels que: une concentration cellulaire élevée et une production plus rapide d'éthanol et, en étudiant ses variables, il est possible de réduire les coûts de cette méthode d'immobilisation.

**Mots-clés:** Encapsulation. Fermentation Alcoolique. Levures Immobilisées.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pesquisa de Nelson e Griffin em 1916.....	14
Figura 2 - Diferentes Métodos da Imobilização Celular.....	17
Figura 3 - Ligações Entre a Célula e o Suporte de Imobilização.....	18
Figura 4 - Esquema do Procedimento de Encapsulação Celular em Alginato de Cálcio .....	21
Figura 5 - Estrutura do Alginato: Ácido Manurônico (M) e Ácido Gulurônico (G) .....	22
Figura 6 - Formação do Gel de Alginato de Cálcio Através de Estruturas Químicas	23
Figura 7 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Obtida Através de Microscópio.....	25
Figura 8 - Primeira Fase da Glicólise: Fase Preparatória.....	27
Figura 9 - Segunda Fase da Glicólise: Fase de Produção de Energia .....	28
Figura 10 - Redução do Ácido Pirúvico .....	29
Figura 11 - Etapas do Preparo da Sidra Natural .....	30
Figura 12 - Equipamento Utilizado Para a Encapsulação de Leveduras em Alginato de Cálcio .....	34
Figura 13 - Esfera de Alginato de Cálcio .....	38
Figura 14 - Texturômetro com as Esferas de Alginato de Cálcio .....	39
Figura 15 - Soluções Para Dissolução das Esferas de Alginato de Cálcio Após Cinco Dias .....	44
Figura 16 - Deformação da Esfera de Alginato de Cálcio Durante o Processo de Encapsulação.....	48
Figura 17 - Fases das Esferas de Alginato de Cálcio na Fermentação Alcolica .....	56
Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Varredura nas Esferas de Alginato de Cálcio Durante a Fermentação Alcoólica na Sidra com Ampliação de 500x.....	65



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Evolução na Técnica de Imobilização Celular Através de Artigos e Publicados.....	14
Gráfico 2 - Consumo da Sacarose e Glicose, Durante 180 Horas de Fermentação Alcoólica.....	41
Gráfico 3 - Consumo da Sacarose em $10^6$ , $8 \times 10^6$ e $2 \times 10^7$ células/mL de Leveduras Imobilizadas, durante 54 Horas de Fermentação Alcoólica .....	43
Gráfico 4 - Consumo de Substrato na Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Livres e Imobilizadas Durante 90 Horas.....	45
Gráfico 5 - Curva de Crescimento Celular de Leveduras Livres e Imobilizadas Durante 84 Horas .....	46
Gráfico 6 - pH Durante 120 Horas de Fermentação com Leveduras Livres e Imobilizadas em Concentrações Diferentes de Alginato de Cálcio (2%, 3% e 4%)...50	
Gráfico 7 - Consumo de Substrato Durante 120 Horas de Fermentação com Leveduras Livres e Imobilizadas em Concentrações Diferentes de Alginato de Cálcio .....	51
Gráfico 8 - Resistência Mecânica das Esferas de Alginato de Cálcio, com 2%, 3% e 4% de Alginato de Sódio, Durante 120 Horas de Fermentação Alcoólica.....	53
Gráfico 9 - Turbidez Durante 120 Horas de Fermentação com Leveduras Livres e Imobilizadas em Concentrações Diferentes de Alginato de Cálcio .....	55
Gráfico 10 - Produção de Etanol e Consumo de Substrato para a Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Imobilizadas com 2%, 3% e 4% de Cloreto de Cálcio, Durante 120 Horas .....	57
Gráfico 11 - Produção de Etanol e Consumo de Substrato para a Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Imobilizadas com $4 \times 10^5$ , $5 \times 10^6$ e $1 \times 10^7$ células/mL de Leveduras, Durante 120 Horas .....	59
Gráfico 12 - Concentração de Leveduras na Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Imobilizadas em 2%, 3% e 4% de Cloreto de Cálcio, Durante 120 Horas .....	60
Gráfico 13 - Produção de Etanol e Consumo de Substrato para Sidra Utilizando Leveduras Livre e Imobilizadas, Durante Dez Dias.....	61
Gráfico 14 - Concentração de Leveduras na Sidra Utilizando Leveduras Livres e Imobilizadas Durante Dez Dias .....	62
Gráfico 15 - Turbidez Durante Dez Dias de Fermentação Alcoólica com Leveduras Livres e Imobilizadas na Sidra.....	63

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1 - Etapas do Desenvolvimento do Estudo.....	32
Quadro 1 - Aplicações Biotecnológicas da Imobilização Celular.....	15
Quadro 2 - Variáveis Observadas nos Testes Preliminares Durante a Encapsulação com Alginato de Cálcio e a Influência no Processo.....	47

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 OBJETIVOS .....	12
1.1.1 Geral .....	12
1.1.2 Específicos .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 IMOBILIZAÇÃO CELULAR .....	13
2.1.1 Aplicações Biotecnológicas da Imobilização Celular .....	15
2.1.2 Métodos da Imobilização Celular .....	17
2.1.2.1 Imobilização celular em superfície .....	18
2.1.2.2 Imobilização por floculação das células .....	19
2.1.2.3 Encapsulação em membranas .....	19
2.1.2.4 Encapsulação através do aprisionamento em matriz porosa .....	20
2.1.3 Química do Alginato .....	21
2.2 MICRORGANISMO .....	24
2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	26
2.4 SIDRA .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 MICRORGANISMO E PREPARADO DO INÓCULO .....	32
3.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	33
3.3 ENCAPSULAÇÃO EM ESFERAS DE ALGINATO .....	33
3.4 TESTES EXPERIMENTAIS PRELIMINARES .....	34
3.4.1 Fermentação Alcoólica Utilizando Fontes de Carbono Diferentes .....	34
3.4.2 Fermentação Alcoólica com Diferentes Concentrações de Leveduras Imobilizadas .....	35
3.4.3 Dissolução das Esferas de Alginato de Cálcio .....	35
3.4.4 Comparação Entre a Fermentação Alcoólica com Leveduras Livres e Imobilizadas .....	35
3.5 EXPERIMENTO .....	36
3.5.1 Efeito da Concentração de Alginato de Sódio .....	36
3.5.2 Efeito da Concentração de Cloreto de Cálcio .....	36
3.5.3 Efeito da Concentração Inicial de Leveduras .....	36
3.6 SIDRA .....	37
3.7 ANÁLISES .....	37
3.7.1 Sólidos Solúveis .....	37
3.7.2 Câmara de Neubauer .....	37

3.7.3 Diâmetro das Esferas .....	38
3.7.4 Resistência Mecânica.....	38
3.7.5 Turbidez .....	39
3.7.6 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	39
3.7.7 Microscópico Eletrônico de Varredura (MEV).....	40
3.7.8 Análise da Cor.....	40
3.7.9 Cromatografia.....	40
3.7.10 Análise Estatística .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>41</b>
4.1 TESTES EXPERIMENTAIS PRELIMINARES.....	41
4.1.1 Fermentação Alcoólica Utilizando Fontes de Carbono Diferentes .....	41
4.1.2 Fermentação Alcoólica com Diferentes Concentrações de Leveduras Imobilizadas .....	42
4.1.3 Dissolução das Esferas de Alginato de Cálcio .....	44
4.1.4 Comparação entre Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Livres e Leveduras Imobilizadas.....	45
4.1.5 Variáveis Observadas nos Testes Preliminares .....	47
4.2 EXPERIMENTO .....	49
4.2.1 Efeito da Concentração de Alginato de Sódio .....	49
4.2.1.1 pH e sólidos solúveis.....	50
4.2.1.2 Diâmetro e resistência mecânica das esferas de alginato de cálcio .....	52
4.2.1.3 Turbidez .....	54
4.2.1.4 Parâmetros observados na fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em diferentes concentrações de alginato de sódio.....	56
4.2.2 Efeito da Concentração de Cloreto de Cálcio.....	57
4.2.3 Efeito da Concentração Inicial de Leveduras .....	58
4.3 PRODUÇÃO DE SIDRA COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS E LIVRES.....	60
4.3.1 Concentração de Etanol, Substrato e Leveduras .....	60
4.3.2 Turbidez e Coloração .....	62
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	64
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico no qual as leveduras transformam açúcares simples, como glicose e sacarose em etanol e dióxido de carbono, sem a presença de oxigênio (processo anaeróbio). Geralmente a levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, por possuir um alto rendimento de reação e baixo custo industrial.

Há muitos trabalhos encontrados na literatura sobre a otimização do processo de fermentação alcoólica, como a modificação de leveduras, meios, temperaturas, tempo, pH etc. Um processo biotecnológico crescente nos estudos atuais, no entanto, é a imobilização celular.

A imobilização celular é uma técnica de aprisionamento de células em matrizes ou suportes de forma que no espaço onde essas células estão, suas atividades catalíticas sejam mantidas (COVIZZI *et al.*, 2007). Há diversos materiais que podem ser imobilizados, como as células de leveduras, bactérias, enzimas, etc.

Essa técnica possui inúmeras vantagens em comparação com o processo convencional, como a utilização de alta densidade celular e a reutilização das células (BATISTA, 2005). Na fermentação alcoólica, possui a vantagem de diminuir o tempo do processo e aumentar a produção, podendo haver a eliminação de processos industriais como a filtração.

A utilização do gel de alginato de cálcio para encapsular as leveduras é um método simples, barato e não tóxico as células (BATISTA, 2005). No entanto há vários parâmetros a serem estudados a fim de conseguir uma encapsulação adequada. Uma das principais vantagens dessa técnica é conseguir uma boa transferência de massa entre as leveduras que estão dentro das esferas de alginato de cálcio com o meio a ser fermentado.

Este trabalho tem como objetivo estudar o processo de imobilização celular de leveduras através da técnica de encapsulação em alginato de cálcio, avaliando as variáveis que interferem na encapsulação, durante a fermentação alcoólica.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

O objetivo geral desse trabalho é estudar a imobilização celular de levedura, pelo método de encapsulação em gel de alginato de cálcio, e seus efeitos na fermentação alcoólica.

### 1.1.2 Específicos

Os objetivos específicos desse trabalho são:

1. Estudar as variáveis do processo de encapsulação com gel de alginato de cálcio;
2. Diminuir os interferentes durante a fermentação com leveduras imobilizadas;
3. Determinar os melhores parâmetros para a encapsulação com alginato de cálcio;
4. Comparar o processo entre a fermentação com leveduras livres e leveduras imobilizadas; e
5. Aplicar os resultados obtidos da fermentação alcoólica em meio sintético para um produto, a sidra.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização celular é um termo que descreve as muitas formas em que as células podem ser encapsuladas ou aprisionadas (BOFO; CASTRO; MEDEIROS, 2005). Pode ser definida como: “Confinamento físico ou localização de células intactas para uma determinada região de espaço; sem perda da atividade biológica desejada” (WILLAERT, 2011). Covizzi *et al.* (2007) destacam que a imobilização celular é uma das alternativas encontradas com a finalidade de “engenheirar” os microrganismos.

A célula imobilizada é uma célula em que por meios naturais ou artificiais é impedida de se mover, independente do que está ao seu redor, para a fase aquosa do sistema em estudo (TAMPION; TAMPION, 1988). No espaço onde as células estão confinadas são mantidas suas atividades catalíticas, em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando a reutilização das mesmas e podendo aplicar em escala laboratorial ou industrial (COVIZZI *et al.*, 2007).

As características físicas e bioquímicas da matriz imobilizante e o método utilizado são fatores essenciais em um adequado sistema de imobilização. Assim, esses fatores podem sempre variar de um caso a outro, mas há alguns fatores que geralmente são desejáveis em todas as imobilizações, como: ser reutilizável, possuir uma fácil separação das células, ser economicamente viável, não ser tóxico às células, suportar uma massa celular elevada, entre outros (WILLAERT, 2011).

Essa técnica iniciou-se quando Nelson e Griffin em 1916 relataram que a enzima invertase, quando adsorvida em carvão ativado, tinha a mesma atividade que a enzima solúvel (Figura 1), mas foi a partir dos anos 60 que os estudos evoluíram (ASSIS *et al.*, 2010).

**Figura 1 - Pesquisa de Nelson e Griffin em 1916**

{CONTRIBUTION FROM THE ORGANIC LABORATORY, COLUMBIA UNIVERSITY AND THE HARRIMAN RESEARCH LABORATORY No. 263.}

**ADSORPTION OF INVERTASE.**

By J. M. NELSON AND EDWARD G. GRIFFIN.

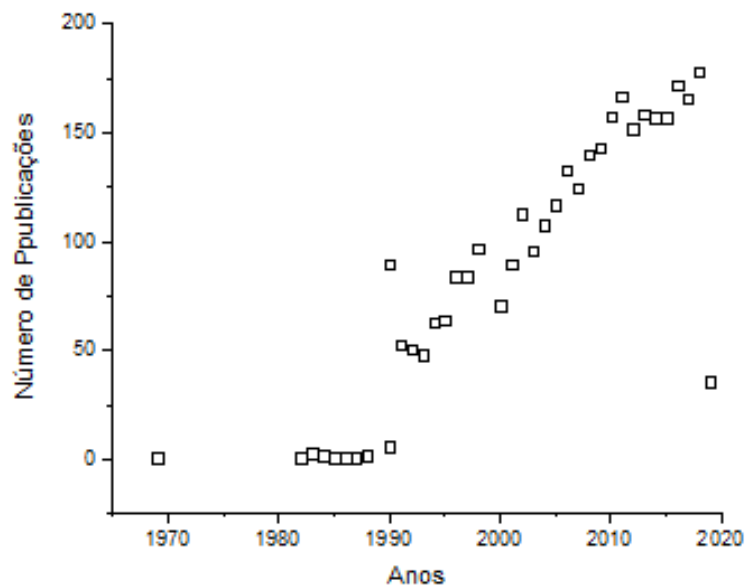
Received March 11, 1916.

Hedin and his collaborators, Jahnson-Blohm, and Eriksson,<sup>1</sup> found that the presence of certain substances like serum, egg albumin, saponin, cholestrin, and in some cases the substrate itself, lessened the inhibition of the activity of enzymes like rennet, trypsin and invertase. brought about by the presence of solid powders (charcoal), or substances soluble in water as colloids (serum and egg albumin). They considered this inhibition as due to the adsorption and removal of the enzyme from the sphere of action by the charcoal or serum. When, however, certain substances capable of being adsorbed by the inhibitor are present or added to the reaction mixture, they can replace part or all of the enzyme in the enzyme-adsorbent, and the liberated enzyme becoming active again, decreases the amount of inhibition.

Fonte: Nelson e Griffin (1916)

O aumento do conhecimento e pesquisas por esta técnica pode ser avaliado pelo crescente número de artigos publicados, como mostra no Gráfico 1. Citando-se a palavra-chave “*cellular immobilized*” na base de dados *Web of Science*, podemos construir um gráfico da evolução.

**Gráfico 1 - Evolução na Técnica de Imobilização Celular Através de Artigos e Publicados**



Fonte: *Web of Science* (2018)

O sistema imobilizado possui vantagens quando comparado com o sistema de células livres: permite a operação em condições de alta densidade celular,



possibilita a reutilização das células em sistemas em bateladas e contínuo (BATISTA, 2005), aumenta a produção e conseqüentemente a eficiência de processos biotecnológicos reduzindo os custos de produção (ZATTERA *et al.*, 2015), possibilita a retirada de etapas do processo como etapas de extração, isolamento, filtração e purificação (COVIZZI *et al.*, 2007).

Mas também é uma técnica com limitações: podendo ser mais caro, a transferência de massa pode afetar a fisiologia e cinética do crescimento celular (COVIZZI *et al.*, 2007), também a evolução de gases e o crescimento celular pode fazer com que a matriz se rompa (WANG *et al.*, 2005).

Há várias condições que podem influenciar na imobilização celular, como as matrizes que podem ser utilizadas, o método de imobilização, a concentração celular inicial e do meio de cultivo, o tamanho das esferas e dos poros (BASSANI, 2018). Essas condições fazem com que o rendimento, eficiência e velocidade da fermentação sejam diferentes. Esses fatores levam a vários estudos do melhoramento da imobilização celular e pode-se observar que é necessário escolher uma adequada metodologia.

### 2.1.1 Aplicações Biotecnológicas da Imobilização Celular

A imobilização celular vem ganhando importância em diversas áreas nos últimos anos (ELAKKIYA; PRABHAKARAN; THIRUMARIMURUGAN, 2016), podendo ser aplicada a todos os tipos celulares: fungos, bactérias, células vegetais e animais (Quadro 1).

**Quadro 1 - Aplicações Biotecnológicas da Imobilização Celular**

Aplicação	Agente Imobilizante/Microrganismo	Matriz utilizada	Referência
Produção de ácidos orgânicos	<i>Rhizopus oryzae</i> ; <i>Actinobacillus succinogenes</i>	Criogel de PVA	MASLOVA <i>et al.</i> , 2019
Descoloração de efluente têxtil	<i>Brevibacillus laterosporus</i> e <i>Galactomyces geotrichum</i>	Alginato de cálcio PVA Esponja de aço inoxidável e PUF	KURADE <i>et al.</i> , 2019
Remoção do cianeto	<i>Alcaligenes sp</i>	PUF	LI <i>et al.</i> , 2019
Produção de bioetanol	<i>Saccharomyces diaststicus</i>	<i>Mucuna urens</i>	ADELABU <i>et al.</i> , 2019
Lise enzimática	Lisozima	Zeólito NA-Y	LEE <i>et al.</i> , 2019

Biodetxificação	<i>Bordetella sp</i>	Quitosana	SINGH <i>et al.</i> , 2019
Produção de lipase	<i>Bacillus subtilis</i>	Alginato	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019
Clarificação de sucos Suco de fruta	Pectinase	Alginato de cálcio	DENG <i>et al.</i> , 2019
Tratamento de efluentes	Microalga	Alginato	KATAM; BHATTACHARYYA, 2019
Remoção de metais pesados	<i>Rhodococcus opacus</i>	Microesferas sintéticas	DOBROWOLSKI <i>et al.</i> , 2019
Produção de pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Alginato de calcio	LIU <i>et al.</i> , 2019
*PVA: álcool polivinílico; PUF: fibra de poliuretano; CA-PVA: filme de alginato de cálcio-álcool polivinílico			

**Fonte: Autoria própria**

Percebe-se a partir dos dados da Quadro 1 que a imobilização celular não é apenas aplicada em diferentes gêneros de microrganismos, mas também utilizada para enzimas e algas. Há diversas matrizes imobilizantes que podem ser aplicadas tais como o alginato, álcool polivinílico, a quitosana, e ainda pode-se utilizar plantas, assim como Adelabu *et al.* (2019) utilizaram a *Mucuna urens* para imobilizar leveduras para a produção do bioetanol.

Pigmentos produzidos a partir da fermentação, lipases produzidas por *Bacillus subtilis*, produção de ácidos orgânicos por várias células microbianas, são alguns exemplos que demonstram um dos focos da imobilização celular, assim como o aumento da produtividade de compostos (LIU *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019.; MASLOVA *et al.*, 2019.).

A imobilização tem muitas aplicações como medida para melhorar o meio ambiente, podendo ser aplicado na biorremediação de águas residuais, diminuindo o cianeto e carbono presentes, descolorindo corantes descartados pelas indústrias têxteis, ou também na remoção de metais pesados (LI *et al.*, 2019).

Em indústrias alimentícias também se utiliza a imobilização celular, como na produção de bebidas ou clarificação de sucos, com o objetivo de remover algumas etapas do processo, como a filtração, e também conseguir uma fácil remoção dos microrganismos (DENG *et al.*, 2019).

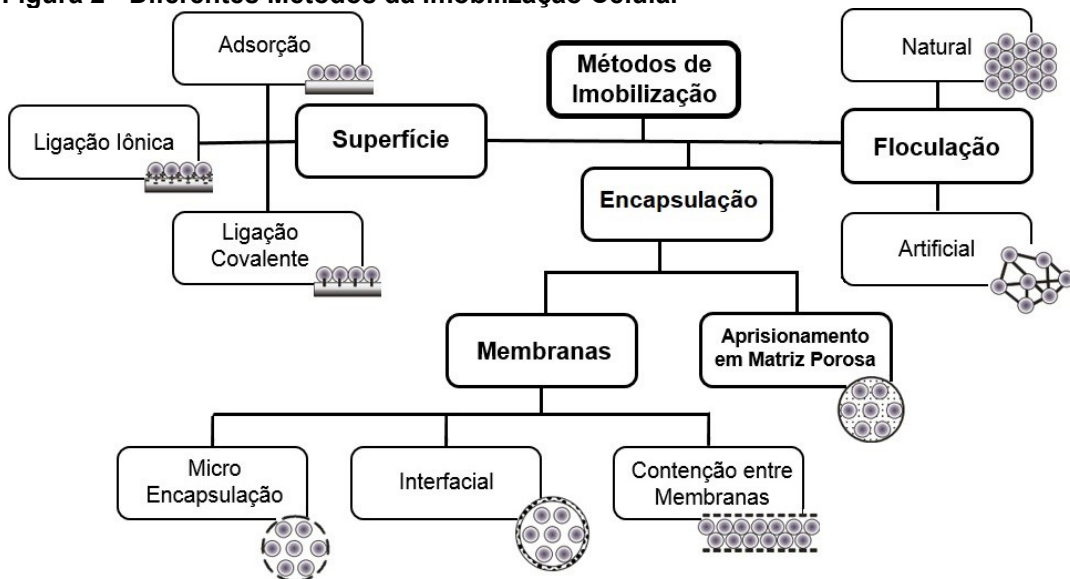
Uma busca sistemática realizada por Kovaleski (2017) relata que a técnica de imobilização celular de leveduras utilizando a encapsulação em matriz de alginato de cálcio tem inúmeras aplicações, sendo que a produção do etanol foi a mais relatada em artigos científicos.

Zattera *et al.* (2015) imobilizaram leveduras para produção de vinhos e espumantes, comparando o rendimento, eficiência e a velocidade dos processos fermentativos. Obteve-se que para esses 3 parâmetros o tratamento com a levedura imobilizada foi um pouco menor, mas apesar disso o resultado foi satisfatório pois houve uma redução de etapas, como a *remuage*, clarificação e filtração.

### 2.1.2 Métodos da Imobilização Celular

Os métodos de imobilização celular podem ser divididos pela interação entre a matriz e o agente imobilizante. Essas interações podem ser através de ligações iônicas, covalentes ou adsorção em uma superfície, podem ser encapsuladas em membranas ou matrizes porosas, ou podem se agrupar através de floculação (Figura 2).

**Figura 2 - Diferentes Métodos da Imobilização Celular**



**Fonte: Autoria própria**

Também pode-se utilizar mais de um desses métodos para a imobilização celular, denominado de imobilização híbrida (COVIZZI, 2007). Tacin (2015) encapsulou a enzima álcool desidrogenase com a matriz de alginato de cálcio e depois acrescentou uma membrana de quitosana, para obter melhores resultados da imobilização.

### 2.1.2.1 Imobilização celular em superfície

Para a imobilização celular em superfície é necessário a escolha de um suporte adequado, segundo Mendes (2009, p.13) as principais características a serem observadas são: “área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custos e outras”.

Há três tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização (Figura 3), ligação iônica, covalente e por adsorção.

**Figura 3 - Ligações Entre a Célula e o Suporte de Imobilização**



**Fonte: Covizzi (2007)**

A ligação entre a célula e o suporte por adsorção se dá por ligações de baixa energia, como Van der Waals, ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, entre outras. Já a imobilização por meio de ligações covalentes possui uma interação mais estável e forte (ELAKKIYA; PRABHAKARAN; THIRUMARIMURUGAN, 2016).

Há diversos materiais que podem ser utilizados para essa imobilização, como sefax, resina sintética, celulose, polietileno, polipropileno etc. Também pode-se utilizar aditivos ou solventes durante o processo de imobilização, para melhorar a eficiência (VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Monteiro *et al.* (1993) estudaram a imobilização da lipase por adsorção em suportes de polipropileno sob diferentes condições. Relataram que houve um aumento significativo da atividade da enzima quando realizado o pré-tratamento do suporte com solvente orgânico. Segundo os autores, acontece uma melhor adsorção da proteína ao suporte pois o solvente polar “absorve” as moléculas de água fazendo com que essas não escapem durante o processo.

Conceição *et al.* (2014) imobilizaram a enzima peroxidase em sílicas mesoporosas com diferentes tamanhos e volumes de poros para possível comparação. Para isso, as sílicas foram ativadas com glutaraldeído 2,5% para realizar a imobilização por ligação covalente. Observou-se que quando a sílica possuía

tamanhos de poros maiores a eficiência da imobilização aumentava, provando assim que os tamanhos dos poros influenciam na imobilização.

O tempo, temperatura, pH e concentração da enzima invertase foram avaliados quando imobilizada em resinas através de ligações iônicas. Cabral *et al.* (2012) conseguiram encontrar as condições ideais da imobilização da invertase, conseguindo um máximo rendimento na hidrólise da sacarose para obtenção do açúcar invertido, um açúcar muito utilizado nas indústrias alimentícias.

#### 2.1.2.2 Imobilização por floculação das células

Segundo Covizzi (2007, p. 32) “a floculação consiste na formação de agregados celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes floculantes ou ligantes”. Alguns organismos tendem a se agrupar ou formar partículas de flocos naturalmente, como algumas cepas de *Zymomonas mobilis* que formam partículas de flocos naturais que são estáveis mesmo quando expostas a alto cisalhamento em biorreatores (SCOTT, 1983).

Para outros organismos é necessário adicionar um componente para acontecer a floculação, como por exemplo Rehn (2013) que utilizou-se a quitosana para a floculação da *Escherichia coli*. Nesse estudo demonstrou-se o efeito da imobilização com propriedades diferentes da quitosana (pesos moleculares e grau de acetilação). Obteve-se que um maior peso molecular e baixo grau de acetilação foram as propriedades mais favoráveis, resultando em uma boa estabilidade do floco e rápida sedimentação.

#### 2.1.2.3 Encapsulação em membranas

Assim como na imobilização de suporte, a escolha da membrana também irá influenciar na eficiência da imobilização. As membranas sintéticas mais utilizadas são: membranas de ultrafiltração, cerâmica, borracha de silicone, entre outros. O transporte pode ser por difusão e/ou por fluxo induzido, através de uma diferença de pressão sobre a membrana (WILLAERT, 2011).

Chung, Loh e Tay (1998) imobilizaram a bactéria *Pseudomonas* em membrana de polissulfona para a degradação de altas concentrações de fenol. Obtiveram diferentes resultados do sistema com a bactéria imobilizada e livre, sendo que o sistema imobilizado conseguiu degradar uma concentração maior de fenol, por possui uma grande vantagem de que as células não são diretamente expostas à toxicidade do fenol.

Um dos métodos de encapsulação em membranas, é através da policondensação interfacial, no qual um polímero é produzido na interface de duas fases imiscíveis. Essas microcápsulas são produzidas através da imersão de gotículas de tamanho uniforme de uma fase orgânica, em uma solução aquosa (JANSSEN; BOERSMA; NIJENHUIS, 1992).

#### 2.1.2.4 Encapsulação através do aprisionamento em matriz porosa

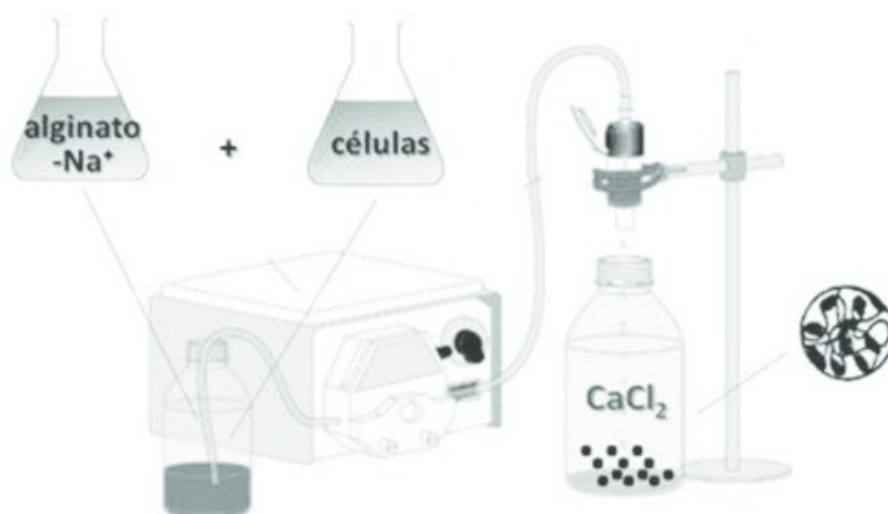
O método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio é a técnica mais utilizada na encapsulação em matriz, por ser um método simples, barato, não tóxico para as células microbianas (BATISTA, 2005). Baseia-se na inclusão de células dentro de uma rede/malha rígida impedindo que as células se difundam no meio e permitem a transferência de nutrientes e metabólitos (JUNIOR, 2006).

A diferença entre a encapsulação em membranas e o aprisionamento em matriz porosa é que quando as células são encapsuladas por uma membrana, as células ficam livres dentro e a membrana por volta, já com o aprisionamento em matriz porosa, essa matriz está contida junto as células.

Além do alginato de sódio também pode-se utilizar outros géis, como: agarose, quitosana, ágar, gomas, etc. A matriz deve ter porosidade suficiente para permitir o transporte de substrato para dentro e fora do produto, enquanto limita às células (SCOTT, 1987).

O método clássico para a encapsulação com matriz porosa é o método de extrusão (ETCHEPARE *et al.*, 2015). Esse método inicia-se pela preparação de uma solução de alginato de sódio, depois junta-se com um volume de suspensão celular. Essa mistura irá gotejar em uma solução de cloreto de cálcio, formando assim pequenas esferas de alginato de cálcio (Figura 4).

**Figura 4 - Esquema do Procedimento de Encapsulação Celular em Alginato de Cálcio**



Fonte: Geise (2015)

A encapsulação em matriz porosa é uma alternativa para o melhoramento de bioprocessos, por isso há inúmeros trabalhos que estudam esse processo para diversas finalidades (BASSANI, 2018). Gu *et al.* (2019) encapsularam um probiótico (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) em esferas de alginato para protegê-los durante o trânsito pelo intestino humano, quando consumidos como alimentos funcionais ou suplementos.

Farbo *et al.* (2016) aplicaram a encapsulação como uma técnica de biossorção de uma micotoxina. A levedura *Candida intermedia* encapsulada em alginato de cálcio foram introduzidas ao suco de uva para remover a ocratoxina (OTA). Xiangliang, Jianlong e Daoyong (2005) utilizaram a mesma técnica, mas para a biossorção de chumbo em efluentes contaminados.

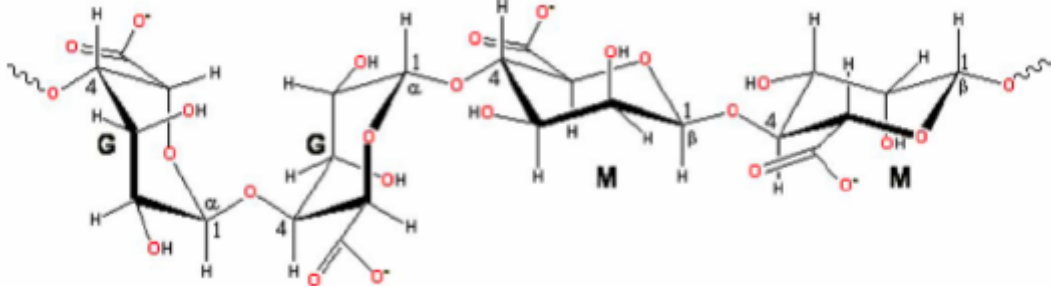
O alginato pode ser produzido industrialmente, através de bactérias, ou ser extraído de algas, o que o torna mais caro (MULLER *et al.*, 2011). Independente da sua origem o alginato possui propriedades de interesse em várias áreas, e essas propriedades são características do alginato devido a sua estrutura química.

### 2.1.3 Química do Alginato

O alginato é um polissacarídeo extraído principalmente de algas marrons e é constituído de sais de ácidos algínicos, sendo esses o ácido manurônico e ácido gulurônico, unidos por ligações 1,4 (Figura 5), mas a composição e sequência pode

variar, dependendo da alga de origem (JUNIOR, 2006). Esses ácidos se ligam formando blocos homopoliméricos M-M e G-G ou heteropoliméricos M-G (ORTIZ, 2017).

**Figura 5 - Estrutura do Alginato: Ácido Manurônico (M) e Ácido Gulurônico (G)**



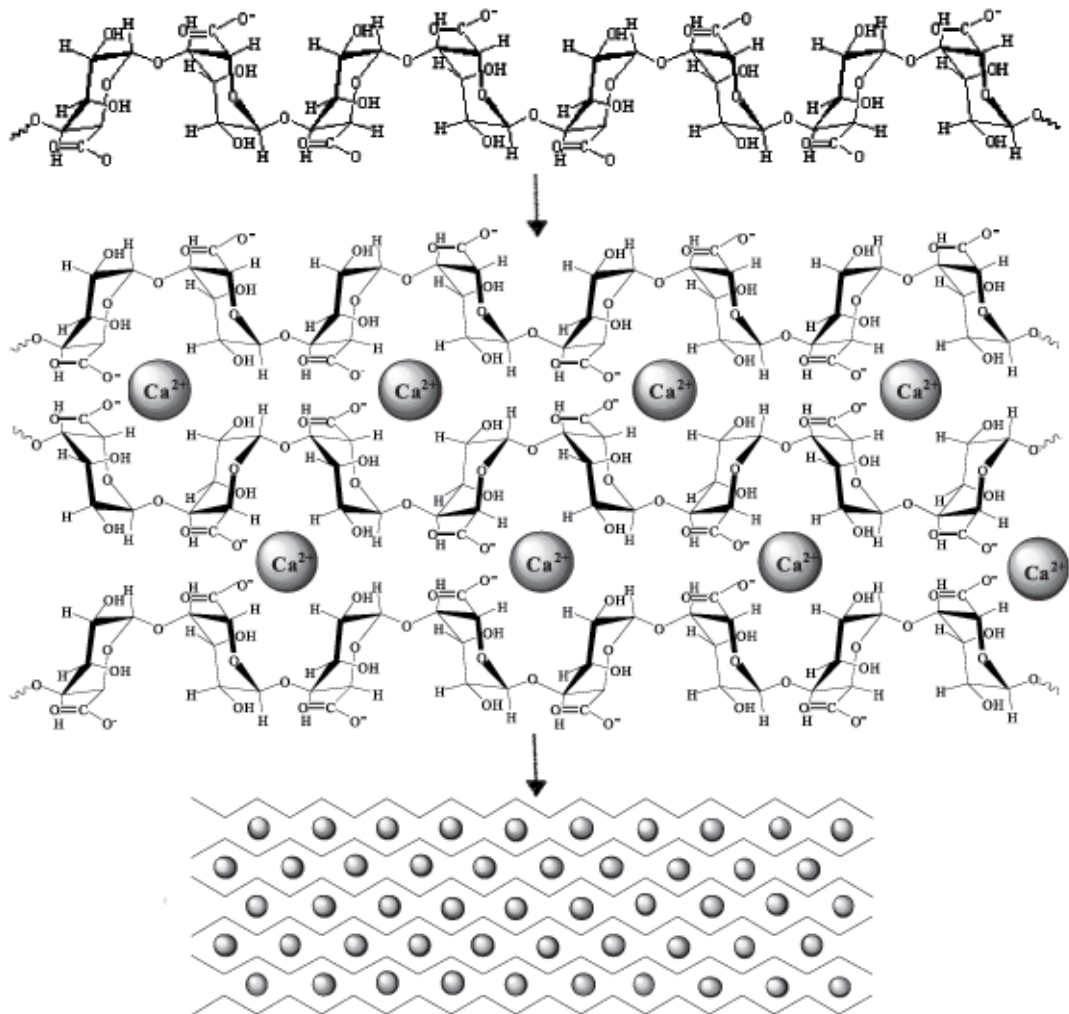
Fonte: Junior (2006)

Devido à sua capacidade de reter água e suas propriedades gelificantes, viscosificantes e estabilizantes, o alginato é muito utilizado nas indústrias de cosméticos, têxtil, farmacêuticas, alimentos (THU; SMIDSROD; BREAEK, 1996.; COSTA, 2019).

O alginato de sódio é solúvel em água e se torna insolúvel na presença de cátions bivalentes, como  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ , por isso o gotejamento em cloreto de cálcio para o processo de encapsulação celular (ORTIZ, 2017). A Figura 6 demonstra a formação do gel de alginato de cálcio através de estruturas químicas.



**Figura 6 - Formação do Gel de Alginato de Cálcio Através de Estruturas Químicas**



Fonte: Kawaguti e Sato (2008)

A primeira etapa representa os homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução, depois ocorre a ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons de cálcio situadas entre os grupos de carga negativa, e por último a formação da rede de gel alginato de cálcio (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Quando utiliza-se o gel de alginato de cálcio para encapsular os microrganismos, esses são adicionados ao alginato de sódio para que eles estejam juntos na formação da rede de alginato de cálcio e permaneçam estáticos. É importante certificar-se que não ocorra uma interação entre o alginato de cálcio e o microrganismo, por isso a encapsulação de leveduras com gel de alginato de cálcio é sempre estudada, pois não há interação “matriz-células”.

## 2.2 MICRORGANISMO

Os microrganismos são aqueles seres vivos que não podem ser observados sem o auxílio de um microscópio, geralmente são constituídos por apenas uma célula. Os principais grupos de microrganismos são: vírus, bactérias, protozoários e fungos. Vírus são seres acelulares, menores e mais simples que a estrutura das bactérias, contem geralmente apenas um tipo de ácido nucléico (DNA ou RNA) (VIEIRA; FERNANDES, 2012), já as bactérias não possuem núcleo e seu DNA está livre dentro da célula (LABACVET, 2017). Os protozoários são seres eucariontes como alguns fungos, mas não apresentam parede rígida como eles (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

A microbiologia é a área que estuda todos esses seres vivos microscópicos e suas atividades. Esse ramo da biologia começou com as lentes de aumento que possibilitavam visualizar os microrganismos. A microbiologia básica estuda a natureza, propriedades, características morfológicas, fisiológicas, genética, ecológica desses microrganismos. Já a microbiologia aplicada estuda o benefício desses seres, como a utilização em processos industriais, produção de alimentos, controle de doenças etc (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

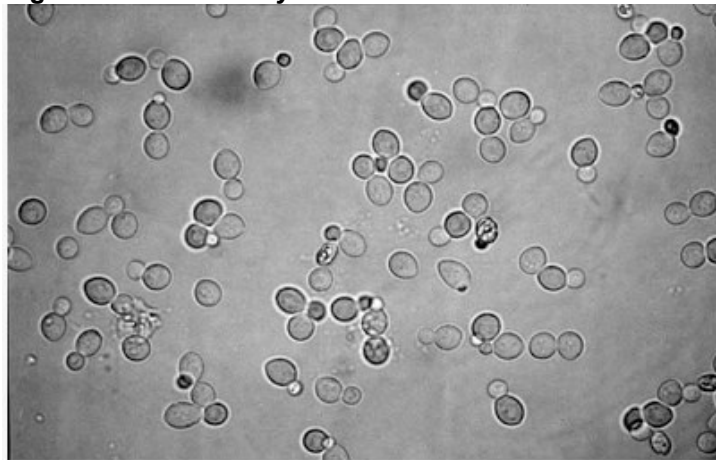
O uso dos microrganismos para produzir produtos que beneficiam e melhoram a vida do homem já acontece há muitos anos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). Segundo Manfio (2003) os microrganismos foram os primeiros seres vivos a colonizar a Terra, sendo que hoje estão em todos os ambientes devido a sua morfologia e sua grande diversidade genética. Os números de microrganismos conhecidos são altos, mas ainda há muitos desconhecidos devido à falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana e às limitações dos métodos utilizados para o isolamento e cultivo desses (PALLERONI, 1996).

Antonie Van Leeuwenhoek é considerado o “pai da microbiologia” por ter sido a primeira pessoa a observar bactérias e protozoários vivos (OLIVEIRA, 2012). Fabricando seus próprios microscópios, pois sabia cortar e polir as lentes, Leeuwenhoek começou a lidar com as lupas para cortar fios de tecido, e após isso ele utilizou o instrumento para observar outras coisas (raspa de seus dentes, água de lagoas, sangue, esperma), descrevendo o que descobria (KARAMANOU *et al.*, 2010). Fabricou mais de 500 microscópios que podiam ampliar um objeto em 200 a 300 vezes do seu tamanho original, observou várias criaturas vivas que chamou de

animalículos, os quais foram renomeados de “microrganismos” no final do século XVII (OLIVEIRA, 2012).

Um dos microrganismos muito estudado para diferentes fins, são as leveduras. Pertencentes ao grupo dos fungos, são organismos eucarióticos e unicelulares encontrados nas plantas, ar, alimentos e solo (QUALI, 2016). Estas se reproduzem por brotamento, onde a célula mãe dá origem a uma ou mais células novas. Grande parte dessas leveduras tem um formato oval (Figura 7).

**Figura 7 - *Saccharomyces cerevisiae* Obtida Através de Microscópio**



**Fonte: Coelho (2013)**

A palavra levedura tem origem no termo latino *levare* com o sentido de “crescer” ou “fazer crescer”. As leveduras podem ser utilizadas tanto na indústria quanto na agricultura. A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais conhecida, também chamada de “levedura de padeiro” ou “levedura da cerveja”, pois são capazes de produzir álcool e dióxido de carbono a partir de açúcares. Ela pode ser aplicada para: inóculo para produção de pão, cerveja e vinho, em rações animais, probióticos para animais e humanos, biocatalizadores em química orgânica, suplementos alimentares, aromatizantes, entre outros.

Atualmente, inúmeras pesquisas são realizadas utilizando as leveduras, como por exemplo a liderada pelo autor Paulino *et al.* (2017) que estudaram diversas leveduras cultivadas no recife brasileiro por serem pouco exploradas nos corais, relatando a importância das leveduras na área ambiental. Lo *et al.* (2017) investigaram leveduras patogênicas em superfícies de frutos, também estudaram a produção de *flavour* por diferentes leveduras (GRONDIN *et al.*, 2017; BERTUZZI *et al.*, 2017), entre muitas outras finalidades, sendo a principal delas: a fermentação alcoólica.

A levedura realiza a fermentação com o objetivo de conseguir a energia química necessária para a sua sobrevivência. Logo, busca-se as condições ideais para que elas trabalhem, obtendo maior eficiência no seu subproduto, que é o álcool.

### 2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O álcool é conhecido desde a pré-história, a arqueologia aponta que algumas civilizações já o usavam, em cerca de 6 mil anos antes de Cristo, com a fermentação de cereais e frutas. Passou a ser consumido de diferentes formas por diversos povos ligados a cultura. Egípcios, romanos, persas e babilônios registraram alguma forma de uso. Apesar de fermentarem mel e cevada, foi a uva que obteve maior difusão entre gregos e romanos que tinham clima e solo favorável para o cultivo, assim o vinho passou a ter importância social, cultural e religiosa até sendo usada de forma medicinal. A maioria dos enólogos dizem que a bebida surgiu por acaso, podendo ter surgido de um punhado de uvas amassadas esquecidas num recipiente, que sofreram as transformações da fermentação (COUTINHO, 2017).

Até o século XIX não havia uma explicação sobre a causa da fermentação. Foi o cientista francês Louis Pasteur, que enquanto estudava problemas dos cervejeiros e vinicultores da França, descobriu que uma determinada levedura produzia um vinho com uma maior qualidade e com outra levedura tornava o vinho azedo. Verificou que a fermentação estava associada ao crescimento de leveduras, mas que se essas fossem expostas a grandes quantidades de oxigênio produziam, em vez de álcool, outros compostos. Assim, Pasteur afirmou que a fermentação é uma consequência da vida sem oxigênio (BERCHE, 2012).

Hoje sabemos que 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.

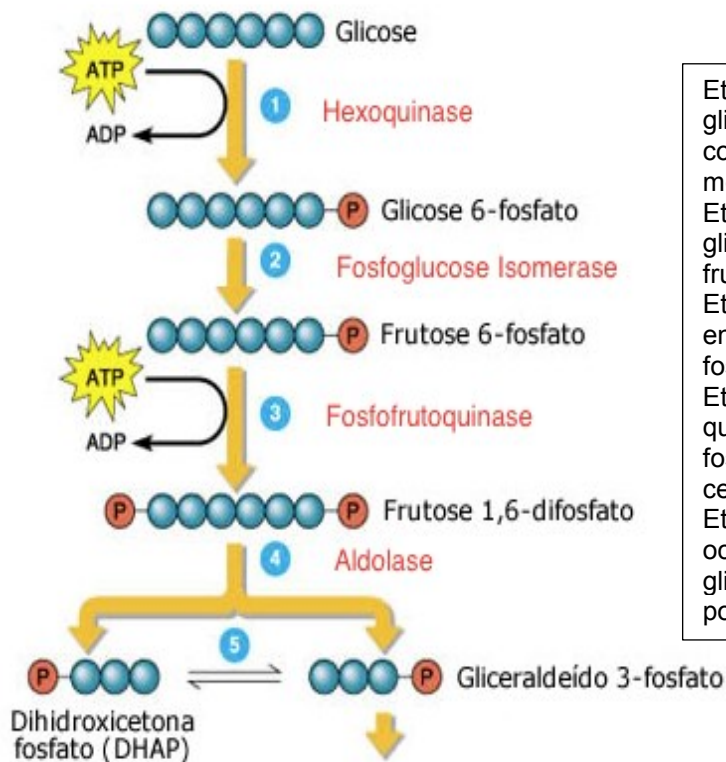


A fermentação alcoólica é dividida em duas fases, a primeira é a glicólise, onde ocorre um conjunto de reações iniciais para a degradação da glicose, sendo semelhante em todos os tipos de fermentação e na respiração aeróbia. A segunda fase é a redução do ácido pirúvico que resulta em ácido acético, ácido láctico, álcool

etílico e dióxido de carbono, dependendo do tipo de organismo utilizado (TAIZ; ZEIGER, 2012).

A glicólise é dividida em duas fases e dez etapas. Na Figura 8 mostra a primeira fase: fase preparatória da glicose, onde ela é ativada para acontecer a quebra depois.

**Figura 8 - Primeira Fase da Glicólise: Fase Preparatória**

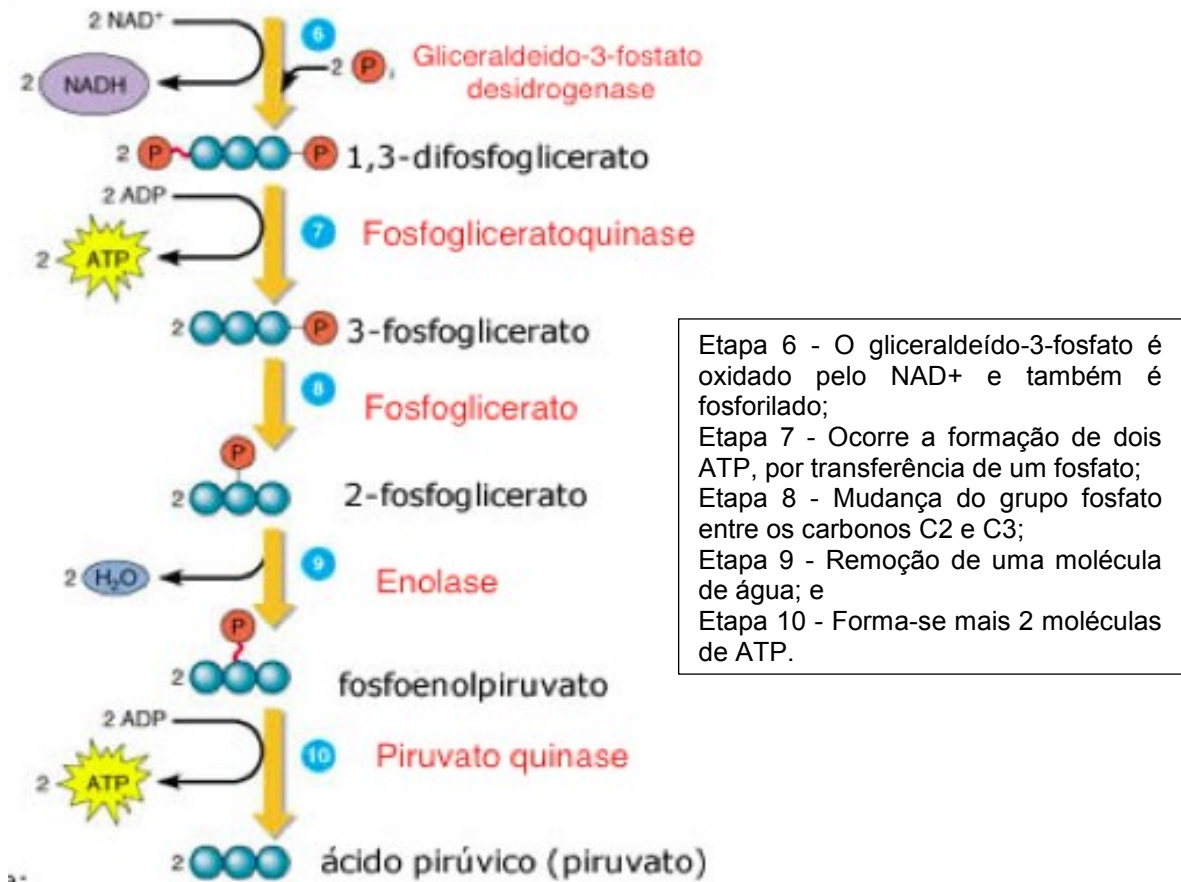


Etapa 1 - Fosforilação da glicose: a glicose entra nos tecidos e é fosforilada com um gasto energético de uma molécula de ATP;  
 Etapa 2 - Isomerização da glicose: a glicose-6-fosfato é isomerizada em frutose-6-fosfato;  
 Etapa 3 - Acontece mais um gasto de energia para fosforilar a frutose-6-fosfato;  
 Etapa 4 - A frutose-1,6-difosfato é quebrada para libertar duas trioses fosfato diferentes, uma aldose e uma cetona; e  
 Etapa 5 - Dihidroxicetona fosfato: ocorre a conversão dessa em gliceraldeído 3P, a única triose que pode continuar sendo oxidada.

Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2012)

A segunda fase da glicólise é a fase de produção de energia, com mais cinco etapas, mostrada na Figura 9.

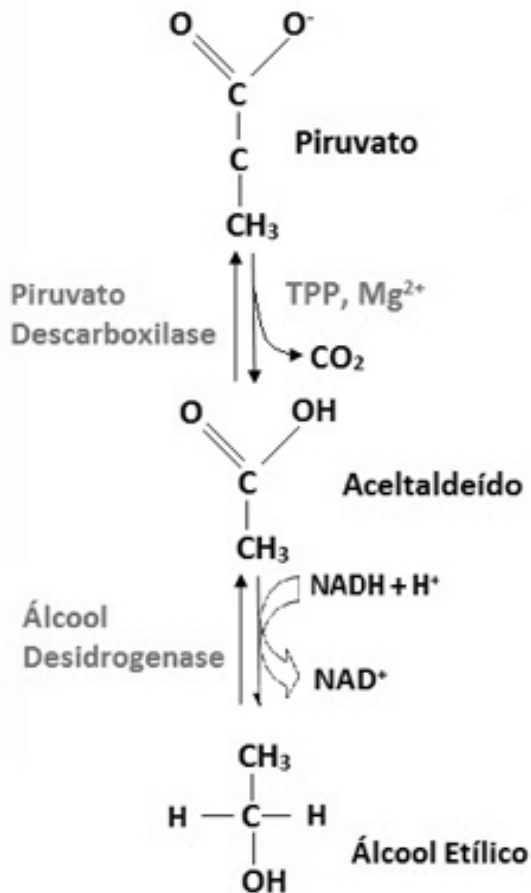
Figura 9 - Segunda Fase da Glicólise: Fase de Produção de Energia



Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2012)

Com o final da glicólise (primeira fase da fermentação alcoólica) obtém-se 2ATP, 2 NADH e dois ácidos pirúvicos. A Figura 10 mostra a segunda fase da fermentação alcoólica, a redução do ácido pirúvico. O piruvato formado na primeira fase sofre descarboxilação formando um acetaldeído, e esse sofre redução, oxidando o NADH e formando o etanol.

Figura 10 - Redução do Ácido Pirúvico



Fonte: Carvalho (2010)

As leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* são as mais utilizadas para a produção de álcool em escala industrial. Mas estudos recentemente estão analisando outros gêneros de leveduras para a fermentação alcoólica. Englezos *et al.* (2018) estudaram a fermentação com uma cultura mista, *Saccharomyces cerevisiae* e *Starmerella bacillaris*

Segundo Lima (2001) há muitos fatores que afetam a fermentação alcoólica, sendo elas físicos (temperatura, tempo, pressão), químicos (inibidores, pH, concentrações iniciais de nutrientes) e microbiológicos (tipo e concentração de leveduras, contaminação), podendo prejudicar no rendimento e na eficiência da fermentação.

O estudo realizado por Alcarde (2000) obteve um bom resultado na diminuição de contaminantes através da radiação gama no caldo de cana antes da fermentação, ele relata que na maioria das vezes, a contaminação microbiana na indústria se deve às más condições de assepsia e de uma qualidade ruim de matérias prima.

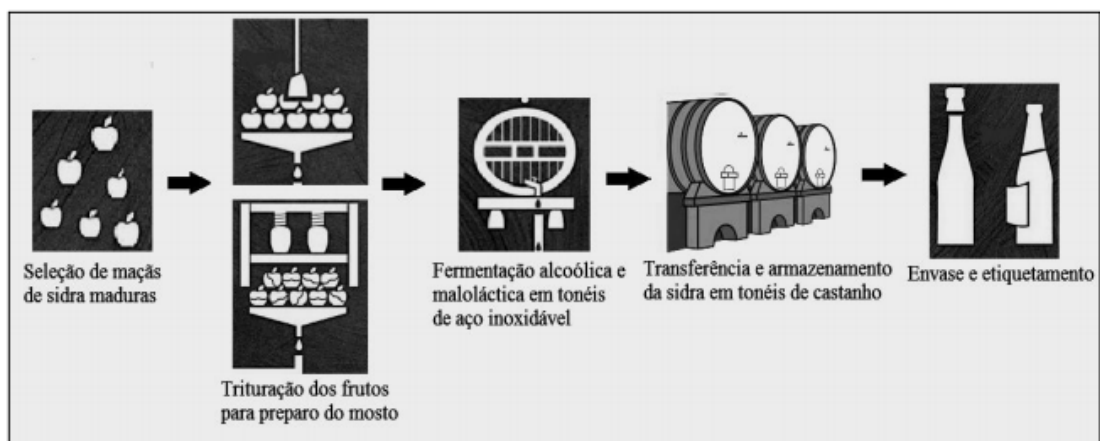
## 2.4 SIDRA

A sidra é uma bebida alcoólica obtida a partir da fermentação alcoólica do mostro de maçã. É produzida e consumida em diferentes regiões da Europa (França, Espanha, Portugal, Escócia, Irlanda, Inglaterra e Áustria), nas américas os países em destaque são: Argentina, Chile, México e Estados Unidos. No Brasil, a sidra é produzida em pequena escala e apresenta pouca significância no mercado nacional de fermentados (ROCHA; PUJOL, 2013).

A indústria de sidra utiliza cerca de 1.000.000 toneladas de maçã por ano, sendo a França o maior produtor de maçãs para sidra por ano (260000 toneladas), e o Reino Unido em segundo lugar com 200000 toneladas por ano (AICV, 2017). As diferenças nas práticas de cultivo da maçã para sidra entre os países, gera a comercialização de sidras com uma ampla variedade de características organolépticas (PICINELLI *et al.*, 2000).

A Figura 11 ilustra a fabricação da sidra em cinco etapas: a escolha das maçãs, pré-fermentação (preparo do mosto), fermentação alcoólica, armazenamento e envase.

**Figura 11 - Etapas do Preparo da Sidra Natural**



**Fonte: Rocha e Pujol (2013)**

O processo inicia-se com a seleção de maçãs de sidra madura, onde no desenvolvimento do fruto, ocorre a transformação do amido e ácido málico em frutose, sacarose e glicose (ALONSO, 2004). Depois das escolhas das maçãs, ocorre a trituração dos frutos, utilizando uma prensa pneumática, moinhos hidráulicos ou digestores enzimáticos.



Em seguida começa a fermentação alcoólica e maloláctica. Na fermentação maloláctica acontece a transformação do ácido málico em láctico e a consequente redução da acidez total. Por último a sidra é transferida para um recipiente e armazenado até a hora do envaze.

Durante a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica surgem subprodutos, como os ácidos orgânicos e compostos voláteis, que vão dar para o produto final aspectos de sabor, odor, cor, adstringência, podendo ser uma qualidade ou deficiência (MARIE, 2011; YE; YUE; YUAN, 2014). Esses compostos são responsáveis por alguns benefícios à saúde, como a redução de reações do envelhecimento precoce, prevenção de diversas doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (SÁNCHEZ, 2002).

A acidez é um dos sabores fundamentais para a sidra, é um equilíbrio entre doçura e amargor, sendo o ácido láctico o principal ácido orgânico produzido durante a fermentação maloláctica (MARIE, 2011). A redução da acidez influencia na estabilidade microbiana e também impacta nas características sensoriais da sidra (REUSS *et al.*, 2010).

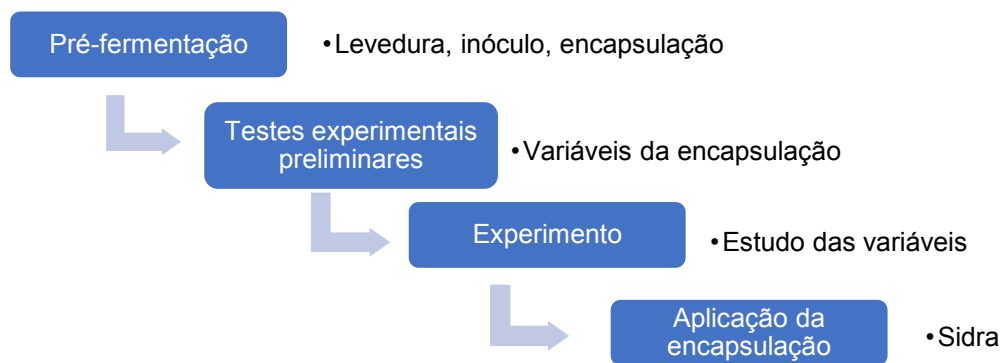
NEDOVIC *et al.* (2000) relataram que o perfil dos compostos voláteis fora diferente entre a fermentação no suco de maçã em um sistema livre e um sistema com leveduras imobilizadas em alginato de cálcio. Isso ocorreu devido a diferentes estados fisiológicos da levedura nos dois processos.

Segundo Garcia (2018), os sistemas imobilizados possuem algumas vantagens para a fermentação alcoólica, como diminuir os riscos de contaminação microbiana, melhor controle e reprodutibilidade dos processos, mas a imobilização causa consequências no comportamento das leveduras, afetando os produtos finais do metabolismo fermentativo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido em quatro etapas: pré-fermentação, testes preliminares, testes experimentais e aplicação da encapsulação, como demonstrado no Fluxograma 1.

**Fluxograma 1 - Etapas do Desenvolvimento do Estudo**



**Fonte: Autoria própria**

Na pré-fermentação escolheu-se a levedura para o estudo assim como o seu meio de cultivo. Parâmetros da fermentação alcoólica como tempo, temperatura, meio, ambiente também foram determinados, e onde e como as leveduras iriam ser encapsuladas.

Os testes experimentais preliminares foram realizados para verificar as possíveis variáveis durante a fermentação alcoólica utilizando as leveduras imobilizadas nas esferas de alginato de cálcio. Já no experimento, realizaram-se para estudar 3 variáveis no processo de encapsulação, a concentração de alginato de sódio, cloreto de cálcio e a concentração de leveduras.

Por último a encapsulação com alginato de cálcio foi aplicada em um produto, a sidra, e comparou-se o sistema imobilizado e o sistema com leveduras livres.

#### 3.1 MICRORGANISMO E PREPARADO DO INÓCULO

A levedura liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN K1-V1116, foi hidratada antes de ser utilizada. Pesou-se 1 grama do liofilizado em um Becker de 50

mL e adicionou-se 10mL de água (esterilizada previamente por 15 minutos, 121°C, 1 atm) deixando em repouso por 15 minutos.

O meio de cultivo utilizado foi o caldo YPD (1% de extrato de levedura (ISO FAR), 2% de peptona (TM MÉDIA) e 2% de sacarose (ALPHATEC). Em um Erlenmeyer de 250 mL, esterilizou-se 100mL do meio na autoclave vertical (PHOENIX) a 121°C por 15 minutos (BATISTITE *et al.*, 2010).

Após o resfriamento adicionou-se 10 mL da levedura hidratada. Esse meio foi colocado em uma estufa B.O.D (ELETROlab, EL101/3RS) por 72 horas à 32°C. Após as 72 horas o meio de cultivo com  $12 \times 10^6$  células/mL, foi colocado em uma geladeira Consul a 11°C.

A cada 15 dias realizou-se o repique das células de levedura. Para isso, acrescentou-se 1mL do meio de cultura anterior para um novo meio YPD estéril. Esse meio YPD com as leveduras foi utilizado para realizar a encapsulação.

### 3.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O meio sintético utilizado para a fermentação foi o meio adaptado de Melo (2006): 140 g/L de sacarose (ALPHATEC), 5g/L extrato de levedura (ISO FAR), 0,7 g/L sulfato de magnésio, 1,2 g/L cloreto de amônio (NEON), 0,95 g/L fosfato monopotássico (NEON).

O pH do meio foi ajustado para 4,5 com ácido clorídrico 1N. Foram transferidos 100mL do meio em Erlenmeyers de 250 mL. Autoclavou-se todos os Erlenmeyers por 15 minutos a 121°C. Depois de adicionas as leveduras (livres ou imobilizadas) foram transferidos para uma estufa B.O.D a 32°C.

A cada 12 horas retirou-se um frasco e realizou-se as análises.

### 3.3 ENCAPSULAÇÃO EM ESFERAS DE ALGINATO

Para obtenção das esferas de alginato com levedura aprisionadas, foram feitas soluções de alginato de sódio (2%, 3% e 4%) (DINÂMICA) em um béquer de 250 mL e adicionou-se água destilada esterilizada a 40°C, homogeneizando-se com

um mixer. Após resfriamento das soluções a 14°C adicionou-se a suspensão contendo a levedura (meio elaborado no item 3.1).

Preparou-se uma solução de 2% de cloreto de cálcio (BIOTEC) e autoclavou-se por 15 minutos a 121°C, 1atm.

Gotejou-se a solução alginato+células na solução de cloreto de cálcio (com agitação magnética), através de um sistema de bombeamento (Figura 12). Deixou-se as esferas em repouso por 15 minutos na solução de cloreto de cálcio.

**Figura 12 - Equipamento Utilizado Para a Encapsulação de Leveduras em Alginato de Cálcio**



Fonte: Autoria própria

### 3.4 TESTES EXPERIMENTAIS PRELIMINARES

#### 3.4.1 Fermentação Alcoólica Utilizando Fontes de Carbono Diferentes

Escolheu-se o açúcar utilizado no meio sintético para a fermentação através de um teste, observando a diferença entre o consumo de substrato da glicose e da sacarose.

Para isso foi realizado uma fermentação por 180 horas, observado apenas os sólidos solúveis dos meios através de um refratômetro. Foram autoclavados 32 Erlenmeyers com 100 mL do meio sintético para a fermentação, 16 de levedura glicose e os outros 16 com a sacarose. Após o resfriamento adicionou-se 1 mL de suspensão contendo levedura em cada Erlenmeyer. Todos os frascos foram colocados na estufa B.O.D a 32°C. A cada 12 horas foi retirado um frasco contendo sacarose e um outro contendo glicose para medida do brix.

#### 3.4.2 Fermentação Alcoólica com Diferentes Concentrações de Leveduras Imobilizadas

Realizou-se uma fermentação para verificar a influência da quantidade de leveduras no gel de alginato de sódio. Para isso foi realizado uma fermentação de 54 horas, com três quantidades diferentes de levedura imobilizadas,  $10^6$ ,  $8 \times 10^6$  e  $2 \times 10^7$  células/mL de leveduras.

Para a encapsulação foram utilizados 2% de alginato de sódio e 2% de cloreto de cálcio. Mediu-se a cada 6 horas o teor de sólidos solúveis e construiu-se gráficos de consumo de substrato.

#### 3.4.3 Dissolução das Esferas de Alginato de Cálcio

Para dissolver as esferas de alginato de cálcio (2% de alginato de sódio e 2% de cloreto de cálcio) foram utilizadas 4 soluções: soro fisiológico, citrato de sódio 1%, fosfato de sódio 1%, fosfato de sódio 10%. Em todas as soluções colocou-se 200 esferas de alginato de cálcio com 3mm de diâmetro em 100 mL de solução.

Depois de 5 dias em temperatura ambiente, os 4 béqueres foram observados.

#### 3.4.4 Comparação Entre a Fermentação Alcoólica com Leveduras Livres e Imobilizadas

Realizou-se 2 fermentações alcoólicas: com  $10^6$  de leveduras livres e  $10^6$  de leveduras imobilizadas. Para a encapsulação foram utilizados 2% de alginato de sódio e 2% de cloreto de cálcio, e 200 esferas para a fermentação.

Realizou-se as análises do teor de sólidos solúveis e contagem em câmara de Neubauer.

### 3.5 EXPERIMENTO

#### 3.5.1 Efeito da Concentração de Alginato de Sódio

Foram testadas quatro amostras: uma com leveduras livres e três com leveduras imobilizadas utilizando concentrações de alginato de sódio diferentes, 2%, 3% e 4%. A concentração de cloreto de cálcio foi de 2% e utilizou-se 200 esferas para todas as fermentações.

Durante 120 horas de fermentação, a cada 12 horas, mediu-se o pH, sólidos solúveis e turbidez do meio fermentado. E nas esferas de alginato de cálcio mediu-se o diâmetro e resistência mecânica.

#### 3.5.2 Efeito da Concentração de Cloreto de Cálcio

Para avaliar a influência do cloreto de cálcio nas esferas de alginato de cálcio foram testadas três concentrações do reagente: 2%, 3% e 4%. A concentração de alginato de sódio foi de 3%. Utilizou-se 200 esferas para todas as fermentações.

Durante 120 horas de fermentação, a cada 12 horas, mediu-se o teor de sólidos solúveis, o etanol e a concentração de leveduras do meio fermentado.

#### 3.5.3 Efeito da Concentração Inicial de Leveduras

Para avaliar a influência da concentração do inóculo foram elaboradas três amostras variando a concentração de leveduras nas esferas de alginato de cálcio,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células/mL aproximadamente. A concentração de alginato de sódio e de cloreto de cálcio foi de 3%. Utilizou-se 200 esferas para todas as fermentações.

Durante 120 horas de fermentação, a cada 12 horas, mediu-se a turbidez, teor de sólidos solúveis e etanol do meio fermentado.

### 3.6 SIDRA

Para a elaboração da sidra foi utilizado um suco de maçã *in natura* comercial sem aditivos. Utilizou-se dois baldes fermentadores de 5L, um para o sistema imobilizado e outro com o sistema de leveduras livres. A fermentação alcoólica ocorreu em 10 dias a 20°C em uma estufa B.O.D. Depois abaixou-se a temperatura para 0°C durante 3 dias e transferiu-se a sidra para outro balde fermentador, onde foi deixado por mais 20 dias para que toda a levedura decantasse. Por último transferiu-se a sidra para garrafas de vidro, adicionando 6 g/L de açúcar para a gaseificação na garrafa.

### 3.7 ANÁLISES

#### 3.7.1 Sólidos Solúveis

Com um refratômetro manual portátil, colocou-se duas gotas do sobrenadante do meio de análise e leu-se o teor de sólidos solúveis em °Brix, e transformou-se em g/L.

#### 3.7.2 Câmara de Neubauer

A concentração de leveduras do meio fermentado foi determinada através da utilização da câmara de Neubauer e em seguida calculada através da fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Para a contagem de leveduras viáveis utilizou-se solução 0,1% de azul de metileno com uma proporção de 1:1 com o meio fermentado.

### 3.7.3 Diâmetro das Esferas

Com um Paquímetro Digital Universal 1,0004 Zaas Precision, 10% das esferas foram medidas a cada 12 horas de fermentação. Anotou-se o maior diâmetro da esfera, como mostra o traço vermelho da Figura 13.

**Figura 13 - Esfera de Alginato de Cálcio**



**Fonte: Autoria própria**

### 3.7.4 Resistência Mecânica

Observou-se a resistência das esferas através da força mensurada por um texturômetro CT3 BROOKFIELD. Foram colocadas 20 esferas na mesa (Figura 14), em um círculo com aproximadamente  $11,34 \text{ cm}^2$ , com velocidade de teste de  $2,0 \text{ mm/s}$  até  $2,0 \text{ mm}$  de deformação, utilizando aparato cilíndrico de acrílico com  $11,34 \text{ cm}^2$  de diâmetro. Essa análise foi realizada em triplicata no início e término da fermentação.



**Figura 14 - Texturômetro com as Esferas de Alginato de Cálcio**



**Fonte: Autoria própria**

### 3.7.5 Turbidez

Quantificou-se a turbidez do meio de fermentação em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez), utilizando o Turbidímetro PoliControl AP2000 WT. O turbidímetro foi calibrado com os padrões de 0,10 NTU, 20 NTU, 100 NTU e 800 NTU. Quando necessário, as amostras foram diluídas.

Aproximadamente 20 mL de amostra foram colocados na cubeta do equipamento para a realização da leitura.

Essa análise foi realizada em triplicada a cada 12 horas de fermentação

### 3.7.6 Potencial Hidrogeniônico (pH)

As medidas do pH foram realizadas em um pHmetro, calibrado com soluções padrões de 4,0 e 7,0. Em um Becker foram colocados 50 mL de amostra e o eletrodo foi imerso para a leitura.

Essa análise foi realizada em triplicata a cada 12 horas de fermentação.

### 3.7.7 Microscópico Eletrônico de Varredura (MEV)

As imagens eletrônicas de varreduras obtidas das esferas de alginato de cálcio apresentadas neste estudo foram obtidas com o equipamento VEGA 3 LMU da Tescan, pertencente ao Laboratório de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Campus Ponta Grossa. As amostras foram metalizadas em um metalizador da marca Quorum modelo SC7620, por um tempo de dois minutos.

As esferas de alginato de cálcio foram secas por cinco horas em uma estufa de secagem a 32°C antes da metalização.

### 3.7.8 Análise da Cor

Para a análise da cor, realizada em triplicata, foi utilizado um espectrofotômetro UltraScan Pro. Os parâmetros avaliados foram os valores das coordenadas de luminosidade ( $L^*$ ), variando do branco ( $L=100$  ao preto  $L=0$ ) coordenadas vermelho/verde ( $a^*$ ) e amarelo/azul ( $b^*$ ).

### 3.7.9 Cromatografia

A análise de etanol das amostras dos itens 3.5.2, 3.5.3 e 3.6 foram analisadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de índice de refração, RID-10 A, operado com coluna AMINEX BIORAD, utilizando como fase móvel  $H_2SO_4$  0,005M (modo isocrático), temperatura de 45°C, volume de injeção de 20  $\mu$ L e vazão de 0,6 mL/min. A identificação foi realizada através da comparação dos tempos de retenção do padrão e do etanol presente nas amostras.

### 3.7.10 Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram realizados no programa Statistica®, com nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

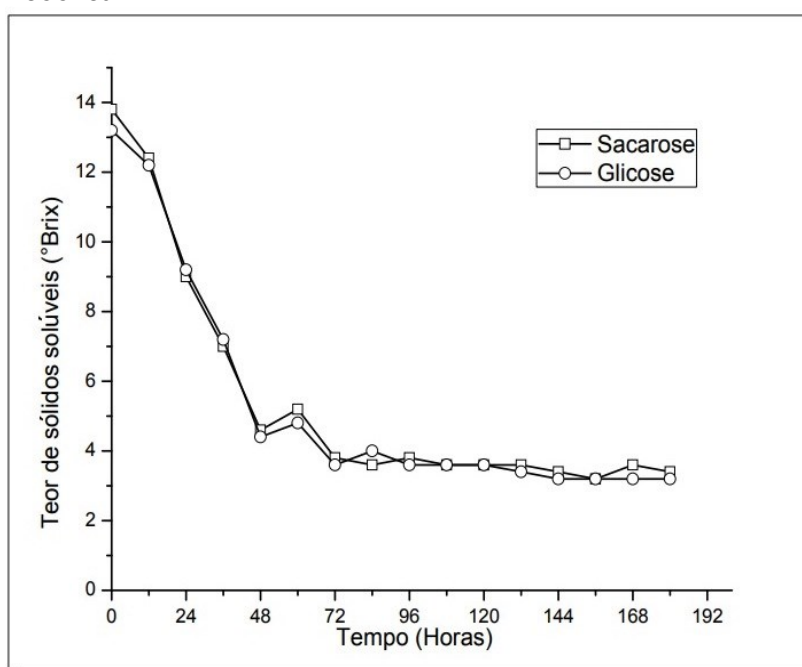
### 4.1 TESTES EXPERIMENTAIS PRELIMINARES

#### 4.1.1 Fermentação Alcoólica Utilizando Fontes de Carbono Diferentes

As leveduras exigem uma fonte de carbono elaborada, açúcares que fornecem a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas principalmente por carbono, oxigênio e hidrogênio. Assim, variando a fonte de carbono, dependendo da levedura, a sua fisiologia pode variar.

Por refratometria, os graus Brix foram quantificados a cada 12 horas, durante 180 horas de fermentação alcoólica. No Gráfico 2 encontram-se os teores de sólidos solúveis para a sacarose e glicose durante as 180 horas.

**Gráfico 2 - Consumo da Sacarose e Glicose, Durante 180 Horas de Fermentação Alcoólica**



Fonte: Autoria própria

Através dos resultados apresentados no Gráfico 2, observa-se a redução do grau Brix com o passar do tempo, mostrando o consumo dos dois açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116. A concentração de sacarose começou com 13,8 °Brix e terminou com 3,4 °Brix (75,36% de consumo), já a glicose começando com 13,3°Brix e terminando com 3,2°Brix (75,93%).

Nas primeiras 48 horas, a fermentação alcoólica mostra-se tumultuosa, 66,66% de consumo para os dois açúcares, ou seja, houve um consumo rápido do açúcar, juntamente com uma alta atividade da levedura. Depois de 72 horas de fermentação observa-se uma menor atividade das leveduras, mantendo de forma constante entre 3,2 - 3,6 °Brix para os dois açúcares.

Duarte (2011) também comparou fermentações com essas duas fontes de carbono, mostrando que os resultados da glicose e sacarose foram bem próximos, 78% e 74,3% de consumo de açúcar, respectivamente. Logo, considerou que não houve diferença no consumo desses açúcares.

Um estudo realizado por Corazza *et al.* (2001) sobre a caracterização do vinho de laranja relata que no começo da fermentação, com 26°Brix a 27°C, as primeiras 30 horas também ocorreu uma fermentação tumultuosa e depois permaneceu constante até as 120 horas de fermentação.

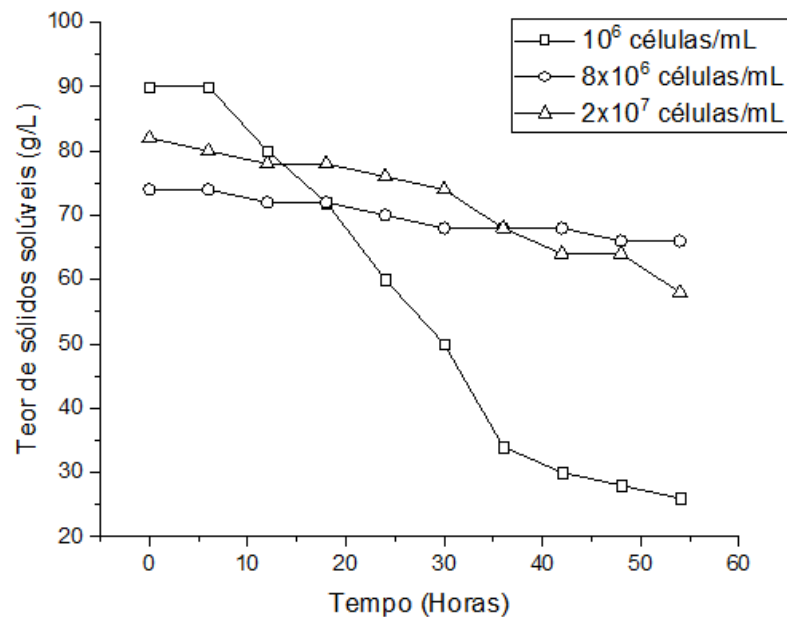
Segundo Marques *et al.* (2016) a fisiologia da *Saccharomyces cerevisiae* pode variar dependendo da fonte de carbono, alterando a sua taxa de crescimento. Ainda revela duas cepas, onde a taxa de crescimento da levedura na sacarose é maior que na glicose, o que pode justificar o consumo dos açúcares estarem próximos.

#### 4.1.2 Fermentação Alcoólica com Diferentes Concentrações de Leveduras Imobilizadas

Uma das maiores dificuldades na imobilização celular é a transferência de massa, ou seja, a transferência de substratos e produtos através da matriz transportadora polimérica (alginato de cálcio). Há diversos fatores que podem influenciar nessa transferência de massa, sendo uma delas, a quantidade de células aprisionadas. Também, identificar a concentração inicial de leveduras pode economizar os recursos no processo.

No Gráfico 3 apresenta-se o consumo da sacarose em  $10^6$ ,  $8 \times 10^6$  e  $2 \times 10^7$  células/mL de leveduras imobilizadas, durante 54 horas de fermentação alcoólica.

**Gráfico 3 - Consumo da Sacarose em  $10^6$ ,  $8 \times 10^6$  e  $2 \times 10^7$  células/mL de Leveduras Imobilizadas, durante 54 Horas de Fermentação Alcoólica**



Fonte: Autoria própria

Com as 54 horas de fermentação alcoólica, conseguimos observar que o consumo de substrato com as esferas de alginato de cálcio com menor densidade celular ( $10^6$  células/mL) teve um consumo de sacarose de 71%, já com as densidades maiores o consumo foi de 11% e 29% respectivamente.

Um estudo realizado por Jiménez (2011), onde utilizou a encapsulação de leveduras em alginato de cálcio 2% para a produção de etanol, relata que o maior consumo do substrato (glicose) foi para as esferas de 3mm com menor densidade celular ( $0,19 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ). Ainda, Williams (1981) relata em seu estudo que a densidade celular nas esferas de alginato é uma importante consideração para a eficiência do sistema, sendo que maiores densidades celulares obtidas na encapsulação produziu maiores taxas de etanol que o sistema com leveduras livres.

Segundo Cha *et al.* (2014) quando é imobilizado um número alto de células de leveduras, essas células competem pelo mesmo acesso aos nutrientes, mas ocorre a inibição do crescimento celular dentro do espaço, e conseqüentemente do consumo da sacarose e produção do etanol.

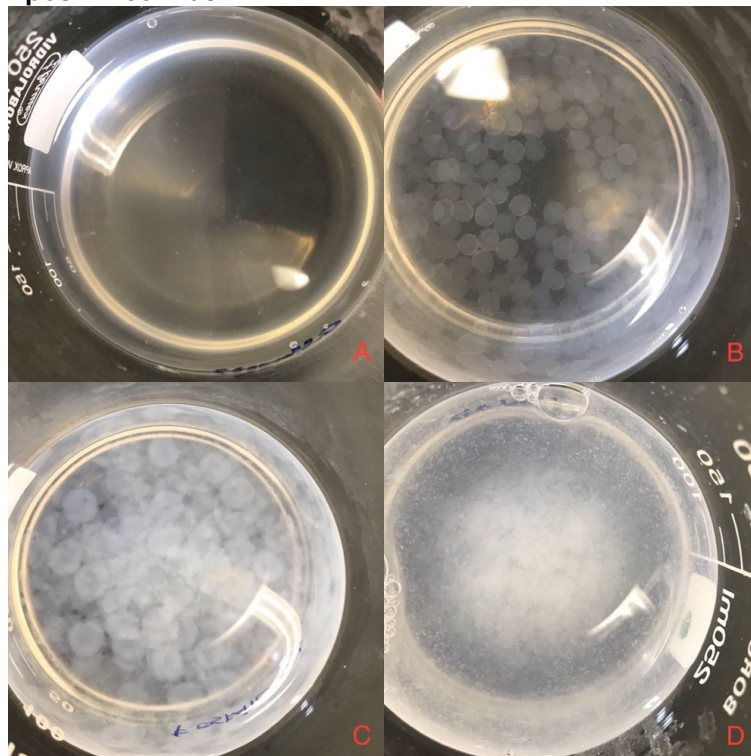
#### 4.1.3 Dissolução das Esferas de Alginato de Cálcio

Para a dissolução das esferas de alginato de cálcio, é necessário um agente sequestrante do cálcio para possibilitar perdas na sua estrutura. Na literatura, são encontrados diversos agentes sequestrantes dos íons de cálcio, como EDTA, polifosfato, citrato, soro, entre outros (GRUNHAGEN, 2002). Com a sua estrutura modificada, o gel fica líquido com as células suspensas na solução.

Com essa dissolução pode-se quantificar as células que estão presentes nas esferas, e verificar se está acontecendo o crescimento celular.

Na Figura 15, estão apresentadas quatro soluções diferentes para possíveis dissoluções das esferas de alginato de cálcio deixadas nas soluções por cinco dias.

**Figura 15 - Soluções Para Dissolução das Esferas de Alginato de Cálcio Após Cinco Dias**



Legenda: A – Citrato de Sódio 1%, B – Soro Fisiológico, C – Fosfato de Sódio 1%, D – Fosfato de Sódio 10%

Fonte: **Autoria própria**

Com o resultado após cinco dias, verificou-se que a solução mais eficiente, ou seja, que dissolveu completamente as esferas de alginato de cálcio, foi a solução de citrato de sódio 1%. O soro fisiológico foi a solução que menos dissolveu as esferas, como mostra a Figura 15 (B).

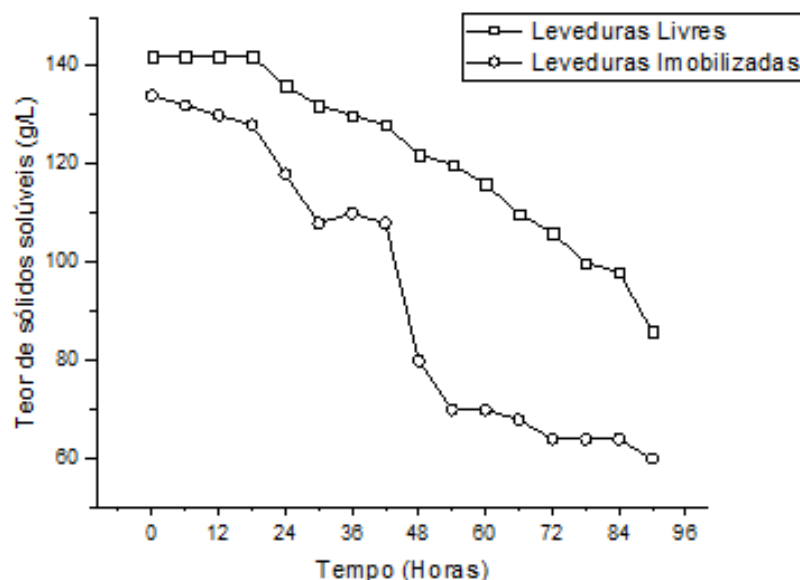
Assim, a solução de citrato de sódio foi utilizada para a dissolução das esferas de alginato de cálcio para os próximos experimentos nesse estudo.

#### 4.1.4 Comparação entre Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Livres e Leveduras Imobilizadas

A fermentação realizada com leveduras imobilizadas comparada com o processo convencional apresenta várias vantagens, sendo uma delas diminuir o tempo de produção e conseqüentemente diminuir os custos. Logo, a comparação entre um método de imobilização e o método utilizando células livres é essencial para possíveis discussões.

No Gráfico 4, estão apresentados resultados da comparação entre o consumo de substrato para a fermentação alcoólica utilizando leveduras livres e a fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas na matriz de alginato de cálcio, durante 90 horas.

**Gráfico 4 - Consumo de Substrato na Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Livres e Imobilizadas Durante 90 Horas**



Fonte: Autoria própria

Com os resultados obtidos, verificou-se um decréscimo do grau Brix maior na fermentação utilizando as leveduras imobilizadas do que utilizando leveduras livres no meio, ou seja, houve um maior consumo do substrato com para a fermentação utilizando as leveduras no gel de alginato de cálcio.

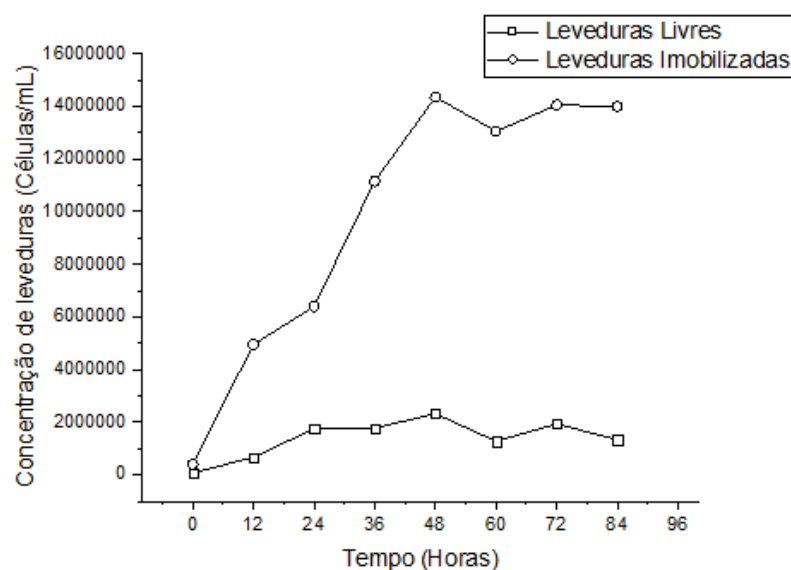
Nas primeiras 24 horas, ocorreu pouco consumo de substrato na fermentação com leveduras livres e também na fermentação com leveduras imobilizadas, 4,22% e 11,94% respectivamente. Estudo realizado por Cheetham (1979) também relata que a atividade inicial das células de leveduras livre em um reator, comparado com leveduras imobilizadas em gel de alginato de cálcio, são semelhantes.

Após as 24 horas e até quase 60 horas, houve um consumo rápido de substrato na fermentação com encapsulação, 47,76%, já com as leveduras livres apenas 18,31%. Nas últimas 30 horas a fermentação com as leveduras livres teve um consumo maior (25,86%) do que as leveduras imobilizadas (14,28%).

Durante toda a fermentação com leveduras livres percebeu-se que o consumo de substrato foi mais constante e menor do que a fermentação com leveduras imobilizadas, onde ocorreu um rápido consumo no início e depois se manteve constante.

Com a mudança de ambiente, de células suspensas no meio para o sistema imobilizado, a cinética e a fisiologia das células de leveduras podem ser modificadas, juntamente com o crescimento celular. Logo, o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* no sistema livre e imobilizado no gel de alginato de cálcio foram comparados por 84 horas de fermentação (Gráfico 5).

**Gráfico 5 - Curva de Crescimento Celular de Leveduras Livres e Imobilizadas Durante 84 Horas**



Fonte: Autoria própria



Através dos resultados apresentados no Gráfico 5 percebe-se que na fermentação utilizando as leveduras livres não ocorreu aumento das células de leveduras, manteve-se constante ou diminuindo com o tempo. Já na fermentação com as leveduras imobilizadas ocorreu um rápido aumento das células até 30 horas e depois decresceu.

Ainda, por meio do Gráfico 5 percebe-se que na fermentação utilizando as leveduras livres ocorreu um crescimento da levedura no início da fermentação, até 24 horas, e depois manteve-se constante. Já na fermentação com as leveduras imobilizadas ocorreu um rápido aumento das leveduras no começo da fermentação e continuou até 48 horas.

Os resultados da câmara de Neubauer demonstraram que o crescimento celular da levedura, em ambientes diferentes, é alterado. Segundo Norton (1995) a imobilização proporciona uma proteção da levedura contra o etanol, resultando nas alterações do crescimento celular.

As células de leveduras que estavam aprisionadas foram dissolvidas em uma solução de citrato de sódio, onde ao passar do tempo demoraram muito mais para ser dissolvidas, começando com 50 minutos indo para 12 horas de dissolução. Assim, um teste de resistência mecânica foi realizado para encontrar possível relação.

#### 4.1.5 Variáveis Observadas nos Testes Preliminares

Nos testes preliminares foi possível verificar 11 variáveis no processo de fermentação utilizando as leveduras imobilizadas no gel de alginato de cálcio. O Quadro 2 apresenta estas variáveis e influência de cada uma no processo.

**Quadro 2 - Variáveis Observadas nos Testes Preliminares Durante a Encapsulação com Alginato de Cálcio e a Influência no Processo**

Variáveis observadas	Influência no Processo
Distância entre o gotejamento do alginato de sódio na solução de cloreto de cálcio Temperatura do alginato de sódio e do cloreto de cálcio Agitação no gotejamento Quantidade de alginato de sódio e cloreto de cálcio para a encapsulação Velocidade do gotejamento	Formação e estabilidade na esfera de alginato de cálcio
Temperatura da dissolução do alginato de sódio Tempo da gelificação	Desestabilização do gel
Tamanho da esfera (diâmetro da saída) Concentração do substrato	Transferência de massa

Concentração de leveduras iniciais	
Quantidade de esferas de alginato de cálcio	

Fonte: Autoria própria

Quando a distância do gotejamento do alginato de sódio na solução de cloreto de cálcio é pequena as esferas ficam mais alongadas, como circulada na Figura 16. Com uma velocidade rápida também ocorre essa formação da esfera. Assim torna-se necessário manter uma distância e velocidade ideal para deixar as esferas mais arredondadas e homogêneas.

Esse parâmetro também foi observado por Culpi *et al.* (2010) onde destacam que a distância ideal entre a saída da esfera até a solução de cloreto de cálcio é de 6 cm. Ainda, Li *et al.* (2013) relataram que de 4cm até 10cm de distância não observou-se diferença na formação da esfera.

**Figura 16 - Deformação da Esfera de Alginato de Cálcio Durante o Processo de Encapsulação**



Fonte: Autoria própria

Durante os testes preliminares foi possível verificar que quanto mais tempo a solução de alginato de sódio ficava na geladeira, ou seja, quanto mais frio, o gel ficava mais homogêneo e com menos bolhas de ar que eram formadas durante a sua dissolução com o mixer. A quantidade de esferas de alginato de cálcio também pode ser variável.

Quanto menor a temperatura do cloreto de cálcio e do alginato de sódio, as esferas ficam mais firmes quando gotejadas na solução. A temperatura da dissolução do alginato de sódio em água não pode ser alta pois pode desestabilizar o gel, por isso a solução de alginato de sódio não pode ser esterilizado em autoclaves (LEO *et*

*al.*, 1990). Neste caso é necessário esterilizar a água que será utilizada para o preparo da solução antes da dissolução do alginato.

O tempo de gelificação, tempo em que as esferas se formam na solução de cloreto de cálcio, quando muito curto pode ocasionar a deformação das esferas de alginato de cálcio quando retiradas da solução antes do tempo (LEE *et al.*, 2013 *apud* SERP *et al.*, 2000).

A agitação no gotejamento ajuda as esferas não grudarem entre si e também uma melhor absorção do cálcio (WOO *et al.*, 2007). O tamanho das esferas de alginato assim como a concentração de substrato irá influenciar na transferência de massa pela superfície de contato (NAJAFPOUR, *et al.*, 2003).

Através dos resultados dos testes preliminares foi possível verificar quais variáveis podemos manter constantes e qual podemos otimizar no processo. Nesse trabalho utilizou-se os seguintes parâmetros:

- Distância entre o gotejamento de 13cm;
- Temperatura do alginato de sódio e do cloreto de cálcio de 14° C;
- 2,5 segundos para formação da esfera até a solução de cloreto de cálcio;
- Temperatura da dissolução do alginato de sódio de 40°C;
- Tempo da gelificação de 24 horas;
- Tamanho da esfera de aproximadamente 3-4mm e 4,22mm de diâmetro da saída; e
- 200 esferas utilizadas para cada 100mL de meio fermentado.

A concentração do alginato de sódio, do cloreto de cálcio e a concentração inicial de leveduras serão estudadas para otimizar o processo de encapsulação com alginato de cálcio.

## 4.2 EXPERIMENTO

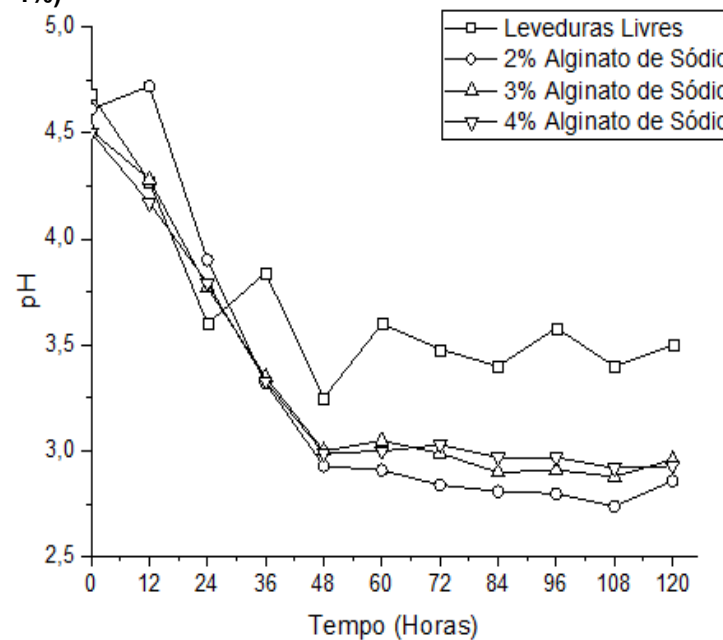
### 4.2.1 Efeito da Concentração de Alginato de Sódio

#### 4.2.1.1 pH e sólidos solúveis

A conversão de substratos durante a fermentação alcoólica em metabólitos como etanol e ácidos orgânicos, realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, modifica o equilíbrio termodinâmico no meio e consequentemente o pH. Além disso, o pH pode influenciar na atividade das enzimas celulares e pode ocorrer alterações nas reações biológicas, como também na cinética (AKIN *et al.*, 2008).

Assim, realizou-se uma comparação entre a fermentação com as leveduras livres e com 3 concentrações de alginato de sódio para a encapsulação das leveduras durante 120 horas (Gráfico 6).

**Gráfico 6 - pH Durante 120 Horas de Fermentação com Leveduras Livres e Imobilizadas em Concentrações Diferentes de Alginato de Cálcio (2%, 3% e 4%)**



Fonte: Autoria própria

Através dos resultados obtidos, percebe-se que houve variação no pH no meio fermentado com as leveduras livres houve variação durante todo o tempo, começando com 4,68 e terminando com 3,4. Já as fermentações com leveduras imobilizadas com 2%, 3% e 4% de alginato de sódio foram mais constantes, começando com 4,61, 4,51, 4,50 e terminando com 2,86, 2,96, 2,93 respectivamente.

Ocorreu um decréscimo durante as primeiras 48 horas da fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas, para as 3 concentrações de alginato de sódio. Akin (2008) relata em seu estudo sobre o pH na fermentação alcoólica, que nas suas

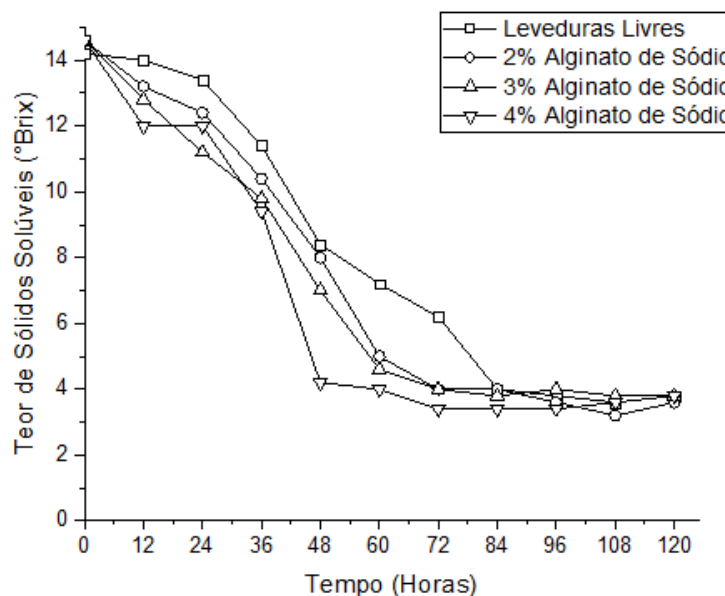
primeiras 50 horas também ocorre um decréscimo do pH, devido ao consumo do nitrogênio pelas leveduras onde produzem íons H<sup>+</sup>.

O menor valor do pH na fermentação com leveduras livres foi de 3,25, com 48 horas de fermentação. Akin *et al.* (2008) também relatou que quando o pH diminui de 4,5 para 3,5, assim como ocorrido no trabalho, a taxa de crescimento específico e a densidade celular são reduzidos.

Segundo Bonassa *et al.* (2013) a viabilidade celular é influenciada pelo pH, afetando o tempo de fermentação e não a concentração final do produto. Ainda, Le e Le (2014) descrevem que as leveduras imobilizadas convertem o substrato em produto mais rapidamente do que as leveduras livres.

Assim, construiu-se no Gráfico 7, curvas do consumo de substrato para a fermentação com leveduras livres e imobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio, durante 120 horas de fermentação alcoólica.

**Gráfico 7 - Consumo de Substrato Durante 120 Horas de Fermentação com Leveduras Livres e Imobilizadas em Concentrações Diferentes de Alginato de Cálcio**



Fonte: Autoria própria

Em 48 horas de fermentação, as leveduras aprisionadas com 2%, 3% e 4% obtiveram um consumo de 45,20%, 52,05% e 71,23% respectivamente, do substrato. Já na fermentação com as leveduras livres o consumo foi mais baixo, 40,84%. Mas os consumos no final da fermentação foram próximos, 72,53% com leveduras livres e 75,3% para as leveduras imobilizadas.

Observa-se que na fermentação com as leveduras imobilizadas o consumo do substrato ocorre mais rápido do que as leveduras livres, mas o consumo final é semelhante. Entre as fermentações imobilizadas, não houve diferença no pH e no consumo do substrato, mesmo com diferentes concentrações de alginato de sódio.

O consumo do substrato da fermentação com a leveduras livres e imobilizadas está relacionada também com o crescimento celular de leveduras (Gráfico 5). Até 48 horas de fermentação com leveduras imobilizadas ocorre um crescimento das leveduras e depois mantém-se constante assim como o consumo de substrato. Já na fermentação com leveduras livres o crescimento celular foi mais constante assim como o consumo de substrato.

#### 4.2.1.2 Diâmetro e resistência mecânica das esferas de alginato de cálcio

O diâmetro das esferas tem grande importância na transferência de massa interna, fazendo com que na transferência de substratos e produtos através da matriz de alginato de cálcio sejam mais eficientes (NEDOVIC *et al.*, 2001).

O crescimento das leveduras dentro das esferas pode causar uma pequena expansão no seu tamanho (NEDOVIC *et al.*, 2001), mas a temperatura com o tempo pode reduzir os tamanhos (SERP *et al.*, 2002).

A Tabela 1 demonstra as medidas dos diâmetros das esferas de alginato de cálcio decorrente as 120 horas de fermentação alcoólica, utilizando três porcentagens de alginato de sódio nas esferas, 2%, 3% e 4%.

**Tabela 1 - Diâmetro das Esferas de Alginato de Cálcio (mm), com 2%, 3% e 4% de Alginato de Sódio, Durante 120 Horas de Fermentação Alcoólica**

Tempo de Fermentação (Horas)	2% de Alginato de Sódio	3% de Alginato de Sódio	4% de Alginato de Sódio
0	3,9537±0,2709 <sup>ab</sup>	4,2881±0,2950 <sup>a</sup>	4,1456±0,2605 <sup>a</sup>
12	4,2287±0,3025 <sup>ab</sup>	4,3800±0,3553	4,2000±0,1377
24	4,2937±0,3014 <sup>a</sup>	4,1968±0,3089	4,2637±0,2171
36	4,2912±0,2860 <sup>ab</sup>	4,4118±0,3232	4,3225±0,3416
48	4,2137±0,2715 <sup>ab</sup>	4,3656±0,3719	4,3275±0,2579
60	4,0325±0,2845 <sup>ab</sup>	4,3575±0,3889	4,3268±0,3173
72	4,2581±0,3328 <sup>ab</sup>	4,4762±0,3877	4,4312±0,3872
84	4,1187±0,3294 <sup>ab</sup>	4,4993±0,4301	4,3700±0,3282
96	3,9337±0,3807 <sup>ab</sup>	4,3912±0,3535	4,3912±0,3595
108	3,9975±0,3292 <sup>ab</sup>	4,3737±0,3295	4,3543±0,3617
120	3,9299±0,3361 <sup>b</sup>	4,2212±0,3090	4,2425±0,3821

<sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os diâmetros durante a fermentação alcoólica (Teste de Tukey, p<0,05)

Fonte: Autoria própria

O diâmetro das esferas com 2%, 3% e 4% de alginato de sódio variou 0,3638mm, 0,3025mm e 0,2856mm respectivamente. Em todas as concentrações de alginato de sódio não ocorreu um aumento ou uma diminuição gradativa durante todo o tempo de fermentação.

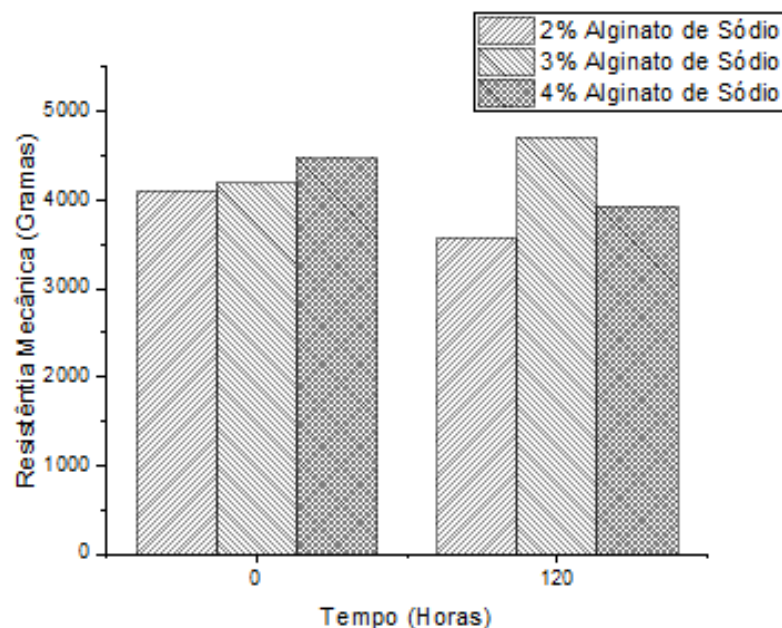
Com 2% de alginato de sódio houve uma diferença significativa dos diâmetros no tempo de 24 e 120 horas, já com 3% e 4% não houve diferença entre os diâmetros. Isso pode ter ocorrido pois com 2% de alginato de cálcio verificou-se um maior vazamento das leveduras das esferas para o meio fermentado.

Apesar da temperatura influenciar na diminuição dos diâmetros pela expulsão da água ou perda de alginato, e do crescimento celular influenciar na expansão, em nenhuma concentração de alginato de sódio isso ocorreu.

Segundo Serp *et al.* (2002) um tratamento térmico pode causar uma reorganização da rede iônica, seguida por uma perda de água, um aumento na concentração do alginato dentro das esferas e conseqüentemente um aumento na resistência mecânica.

Como já relatado, o tempo de dissolução das esferas de alginato de cálcio aumentou durante toda a fermentação, assim, mediu-se a resistência mecânica das esferas de alginato de cálcio em três concentrações de alginato de sódio durante 120 horas de fermentação alcoólica (Gráfico 8), para possível relação.

**Gráfico 8 - Resistência Mecânica das Esferas de Alginato de Cálcio, com 2%, 3% e 4% de Alginato de Sódio, Durante 120 Horas de Fermentação Alcoólica**



Fonte: Autoria própria

Comparando as médias no início da fermentação entre as três concentrações de alginato de sódio, percebe-se que a resistência mecânica aumenta com a concentração de alginato de sódio, sendo 4108g, 4190g e 4475g para 2%, 3% e 4% de alginato, respectivamente.

No final da fermentação com 2% alginato de sódio ocorreu uma diminuição da resistência, o que pode ter ocasionado devido ao maior vazamento das leveduras das esferas para o meio. Com 3% de alginato de sódio a resistência aumentou, mas com 4% diminuiu novamente.

Kostov *et al.* (2010) também observaram que a resistência mecânica aumenta com a maior concentração de alginato de sódio. E constataram que as esferas de alginato tem propriedades elásticas, o que pode influenciar na análise da resistência.

Serp *et al.* (2002) relatam em seu estudo que as esferas de alginato de cálcio quando colocadas a 130°C ocorre um aumento na resistência mecânica, mas quando a temperatura diminui para 110°C e 80°C, essa acontece essa relação com a resistência mecânica. Talvez uma temperatura de 32°C, utilizada nesse estudo, não influencie na resistência mecânica, mas apenas no rearranjo da molécula.

Ainda, Serp *et al.* (2002) dizem ser possível que o calor faz as moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  se movimentarem, ocorrendo uma reorganização da rede iônica de tal forma que as interações iônicas sejam intensificadas dando origem a uma rede mais condensada, da qual a água seria expelida. Isso torna as esferas mais estáveis em citrato de sódio, justificando assim o maior tempo de dissolução das esferas durante o tempo de fermentação.

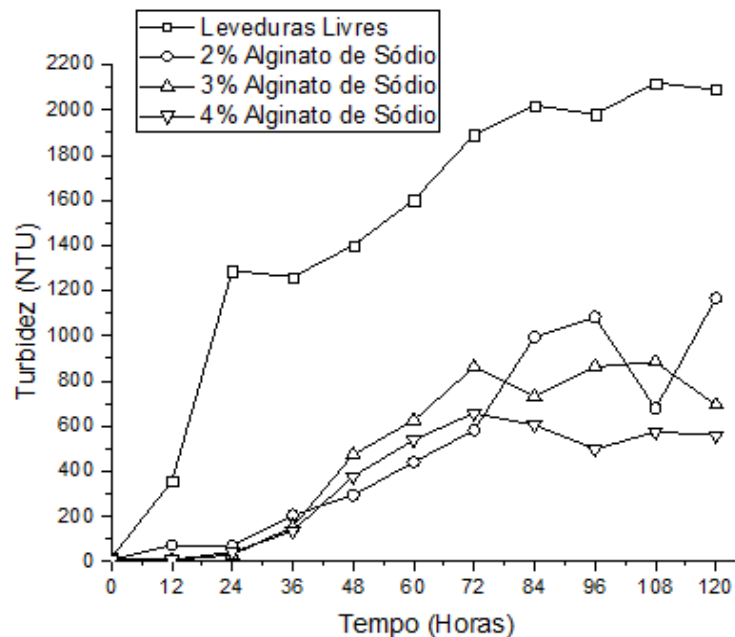
#### 4.2.1.3 Turbidez

A turbidez é uma medida da turvação de líquidos através dos sólidos suspensos contidos. É muito utilizada para verificação de produtos finais, como sucos e vinhos, que passam por processos industriais de clarificação e filtração.

Comparou-se a turbidez de um meio utilizando as leveduras livres com as leveduras imobilizadas em gel de alginato de cálcio, com 2%, 3% e 4% de alginato de sódio, como demonstra o Gráfico 8.



**Gráfico 9 - Turbidez Durante 120 Horas de Fermentação com Leveduras Livres e Imobilizadas em Concentrações Diferentes de Alginato de Cálcio**



Fonte: Autoria própria

A turbidez na fermentação com leveduras livres começou com 17 NTU e teve a maior turbidez, de 2090 NTU, em 120 horas. Já para as fermentações com as leveduras encapsuladas com 2%, 3% e 4% de alginato de sódio, começaram com 6,94 NTU, 6,5 NTU e 7 NTU, e terminaram com 1326,67 NTU, 586,33 NTU e 597,33 NTU, respectivamente.

Normalmente um vinho pronto para consumo possui uma turbidez menor de 2 NTU, mas durante o processo de fermentação, os valores podem ser superiores a 2000 NTU (OLIVEIRA; CLEMENTE, 2003). O mesmo é observado na fermentação utilizando as leveduras livres.

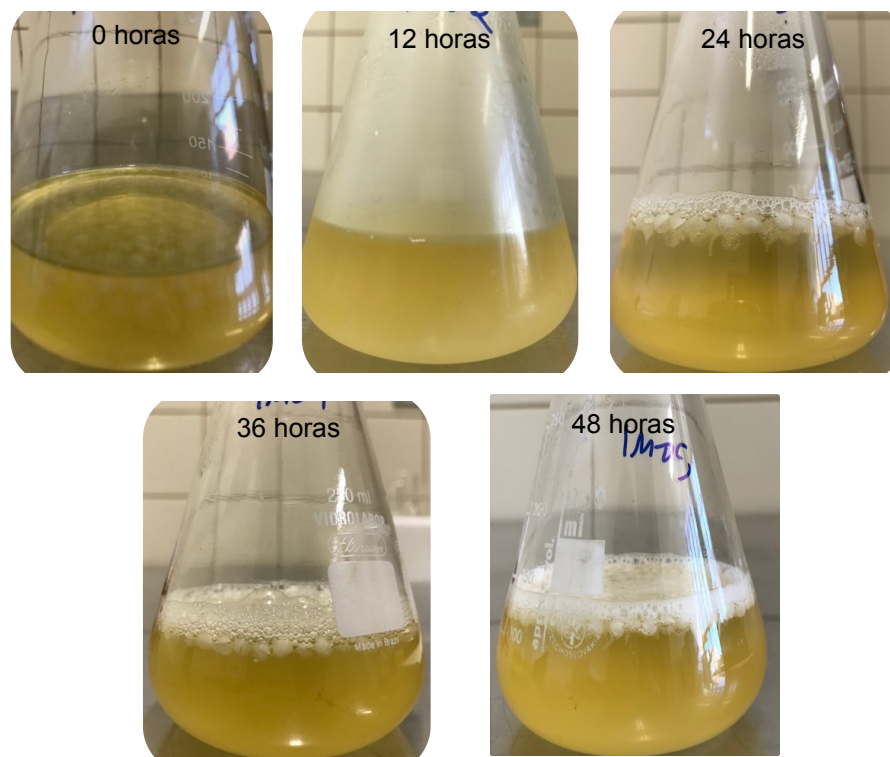
Antoce *et al.* (1997) relatam em seus estudos que o crescimento celular aumenta em função do tempo, assim como a turbidez. Isso pode explicar o porquê na fermentação alcoólica com leveduras livres a turbidez foi maior. Também, na fermentação com 2% de alginato de sódio a turbidez foi maior e menos constante por ter ocorrido um vazamento das leveduras maior que nas outras concentrações

O processo de clarificação, que consiste em retirar sólidos em suspensão na bebida, tem um custo elevado para as indústrias e também podem alterar o sabor da bebida (SENAI, 2014), pois isso, se com o uso da encapsulação não for necessário esse processo, há vantagens para indústrias.

#### 4.2.1.4 Parâmetros observados na fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em diferentes concentrações de alginato de sódio

Em todas as fermentações utilizando as leveduras encapsuladas, quando colocadas no meio, ficavam no fundo do Erlenmeyer, em 12 horas as esferas tornavam-se brancas. A partir de 24 horas as esferas deslocavam-se para a superfície e ocorria a formação de espuma pela produção de  $\text{CO}_2$ , com 36 e 48 horas essa produção se intensificava, como demonstrado na Figura 17.

**Figura 17 - Fases das Esferas de Alginato de Cálcio na Fermentação Alcoólica**



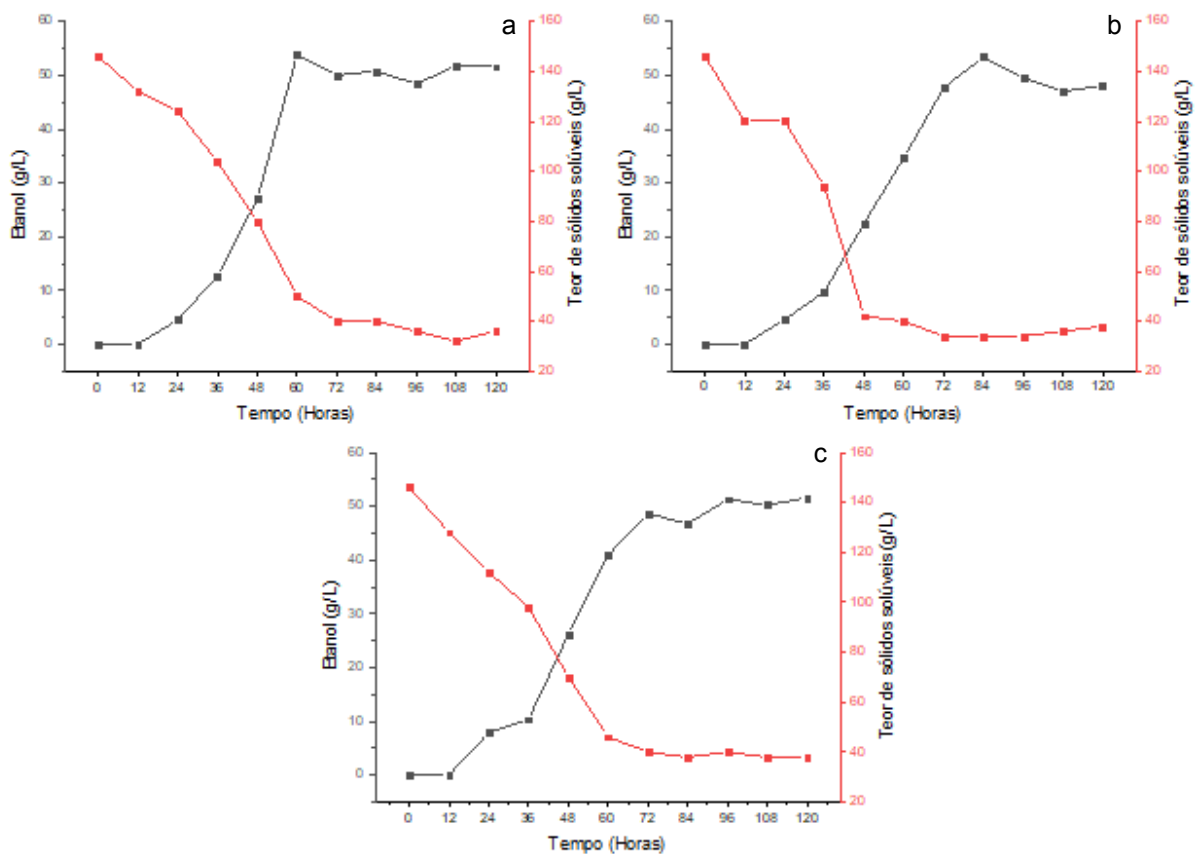
**Fonte: Autoria própria**

A fermentação utilizando 2% de alginato de sódio não foi bem-sucedida nesse estudo por ocorrer o vazamento das leveduras. Apesar da fermentação com 3% e 4% de alginato de sódio terem sido semelhantes em todas as análises, continua-se o trabalho com 3% para diminuir os custos do processo.

#### 4.2.2 Efeito da Concentração de Cloreto de Cálcio

O cloreto de cálcio é o sal mais utilizado no método de encapsulação com o alginato de cálcio (HELGERUD, 2010), pois possui uma resistência mecânica superior a outros sais já estudados para a encapsulação (FARIA, 2013). Segundo Lee e Rogers (2013) a velocidade de gelificação é diretamente proporcional à concentração de cálcio. Logo, uma comparação entre diferentes concentrações de cloreto de cálcio foi estudada (Gráfico 10)

**Gráfico 10 - Produção de Etanol e Consumo de Substrato para a Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Imobilizadas com 2%, 3% e 4% de Cloreto de Cálcio, Durante 120 Horas**



Legenda: a – 2% de Cloreto de Cálcio, b – 3% de Cloreto de Cálcio, c – 4% de Cloreto de Cálcio

Fonte: Autoria própria

A produção de etanol e o consumo do substrato para as três concentrações de cloreto de cálcio foram muito próximas. Em 60 horas de fermentação, com 2% de cloreto de cálcio obteve-se a produção máxima de etanol, de 53,82 g/L, o que condiz com o consumo de substrato de 73,28%, sendo que fermentação finalizou com 78% do consumo de substrato.

Obeve-se uma melhor proporcionalidade entre a produção de etanol e consumo de substrato com 3% de cloreto de cálcio. A partir de 72 horas a produção de etanol manteve-se constante, com aproximadamente 50 g/L, assim como o consumo de substrato (40 g/L).

Com 4% de cloreto de cálcio, a fermentação ocorreu mais lenta, onde obteve-se a produção máxima de etanol em 84 horas de fermentação, mas o consumo de substrato estabilizou em 72 horas.

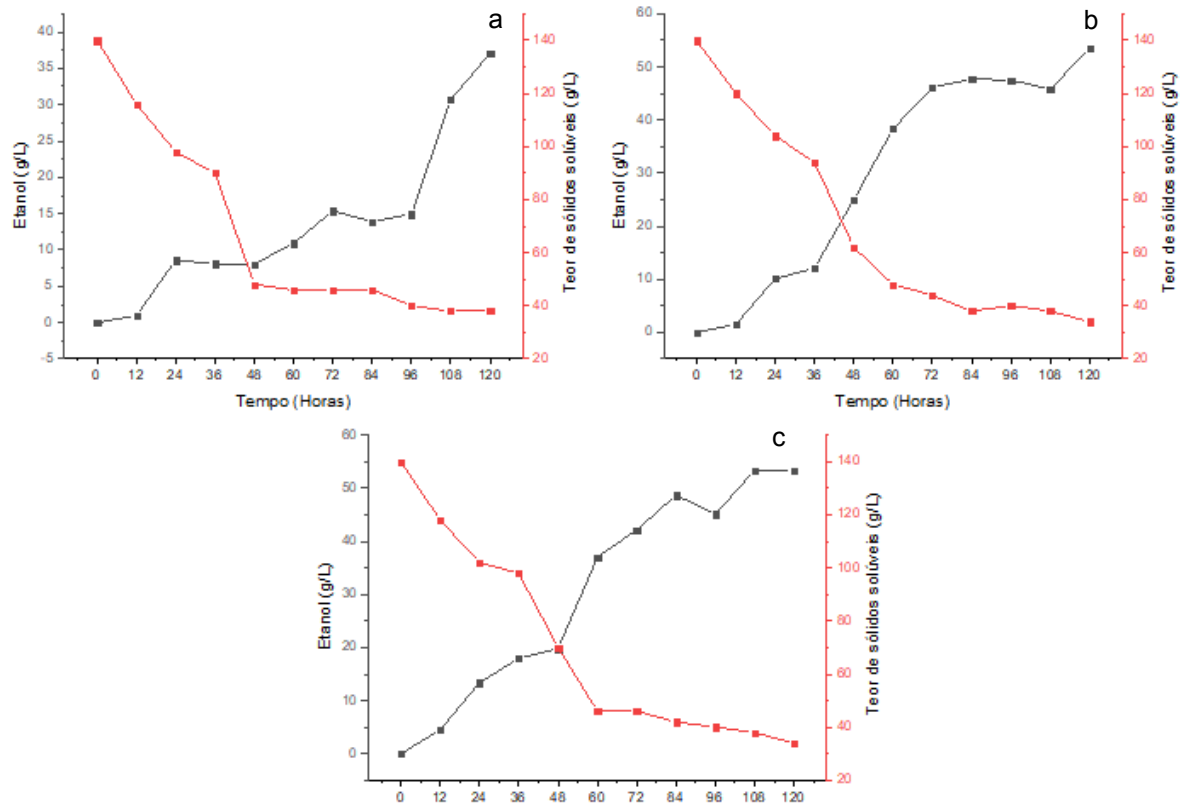
A determinação da concentração do cloreto de cálcio é um parâmetro importante na encapsulação pois quando há um aumento excessivo do cloreto de cálcio no meio, esse sal confere um sabor desagradável e amargo aos produtos alimentares. Também, como a concentração de alginato de sódio, é necessário encontrar a melhor concentração para diminuir os custos do processo de encapsulação.

Como os resultados da fermentação com 3% de cloreto de cálcio foram mais precisos, para as outras fermentações realizadas no estudo utilizou-se essa concentração para realizar a encapsulação.

#### 4.2.3 Efeito da Concentração Inicial de Leveduras

Como já descrito no item 4.1.2 a transferência de massa é uma das dificuldades encontradas na encapsulação, e a concentração inicial de leveduras é um dos parâmetros que influencia nessa transferência. No Gráfico 11 são apresentados os resultados da fermentação utilizando leveduras encapsuladas com diferentes concentrações iniciais de levedura.

**Gráfico 11 - Produção de Etanol e Consumo de Substrato para a Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Imobilizadas com  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células/mL de Leveduras, Durante 120 Horas**



Legenda: a –  $4 \times 10^5$  células/mL, b –  $5 \times 10^6$  células/mL, c –  $1 \times 10^7$  células/mL

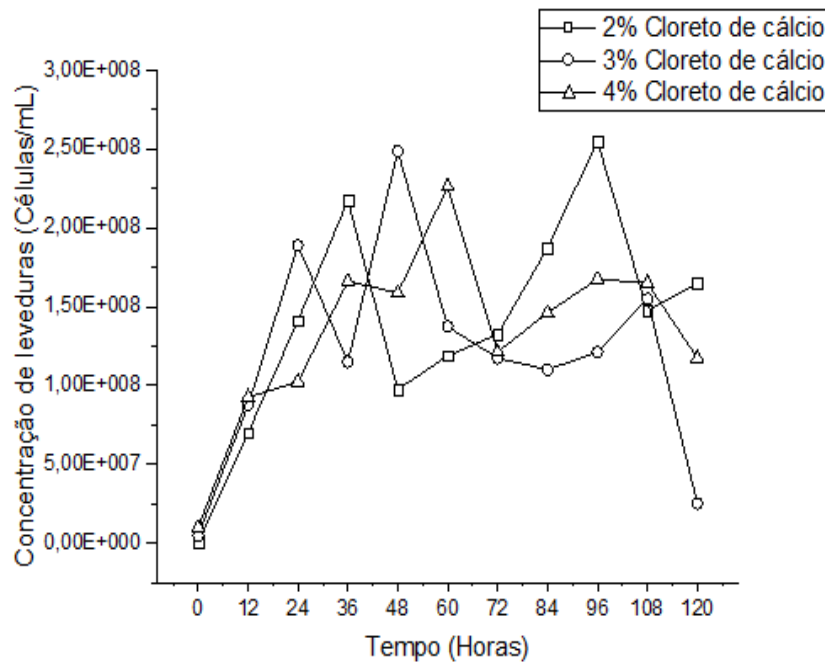
Fonte: Autoria própria

Com a menor concentração inicial de leveduras ( $4 \times 10^5$  células/mL) a produção de etanol foi menor até 96 horas, de 13,90 g/L, enquanto nas concentrações de  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células/mL já havia produzido 47,83 g/L e 45 g/L de etanol.

Observa-se que nos Gráficos 11b e 11c os resultados foram próximos, mas com a maior concentração de leveduras ( $1 \times 10^7$  células/mL) a fermentação alcoólica ocorreu mais rapidamente. Com 108 horas de fermentação a sua produção de etanol foi de aproximadamente 53 g/L, e para a concentração de  $5 \times 10^6$  chegar nessa concentração de etanol foi necessário de 12 horas a mais de fermentação (120 horas).

As concentrações de leveduras durante todo o tempo de fermentação também foram quantificadas (Gráfico 12), mas não obteve-se sucesso com os resultados. Segundo Covizzi (2017) a quantificação da biomassa microbiana imobilizada nas esferas é um problema para o método de encapsulação em processos biotecnológicos.

**Gráfico 12 - Concentração de Leveduras na Fermentação Alcoólica Utilizando Leveduras Imobilizadas em 2%, 3% e 4% de Cloreto de Cálcio, Durante 120 Horas**



Fonte: Autoria própria

Kassim (2012) realizou fermentações com diferentes concentrações iniciais de levedura e também resultou que a maior concentração de levedura resultou em um processo de fermentação mais rápido. Ainda, relata que a encapsulação tem um impacto metabólico no crescimento da levedura, pois em um certo ponto ocorre uma competição nutritiva entre as leveduras.

Na realização desse experimento as esferas de alginato de cálcio eram colocadas nos Beckers e deixados em repouso até o determinado tempo de fermentação. As esferas que ficavam na parte de baixo podem não terem conseguido uma troca o meio, fazendo com que nem todas as esferas ficassem com as mesmas quantidades de células de leveduras.

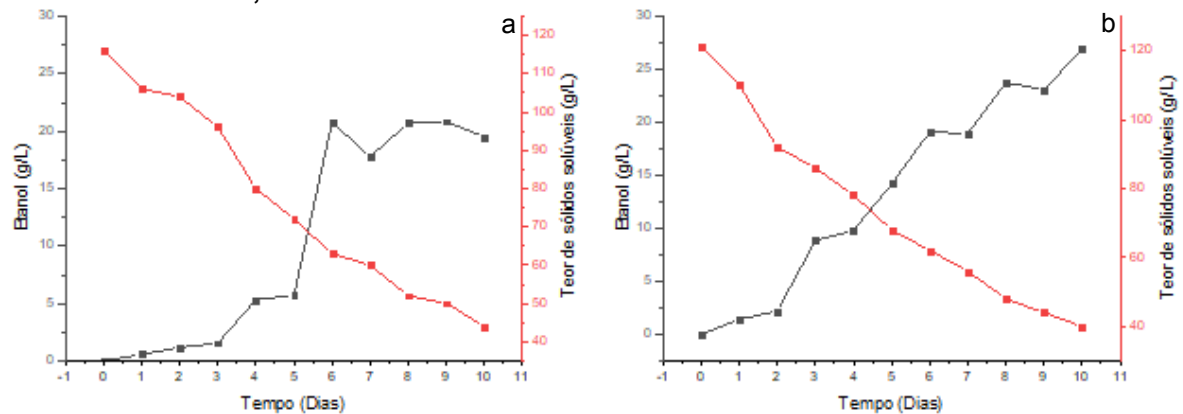
### 4.3 PRODUÇÃO DE SIDRA COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS E LIVRES

#### 4.3.1 Concentração de Etanol, Substrato e Leveduras

Depois de estudar os resultados encontrados nas três variáveis da encapsulação (concentração de alginato, cloreto de cálcio e leveduras) aplicou-os

para a produção de uma sidra com leveduras encapsuladas e comparou-se com uma sidra com leveduras livres (Gráfico 13).

**Gráfico 13 - Produção de Etanol e Consumo de Substrato para Sidra Utilizando Leveduras Livre e Imobilizadas, Durante Dez Dias**



Legenda: a – Leveduras Livres, b – Leveduras Imobilizadas

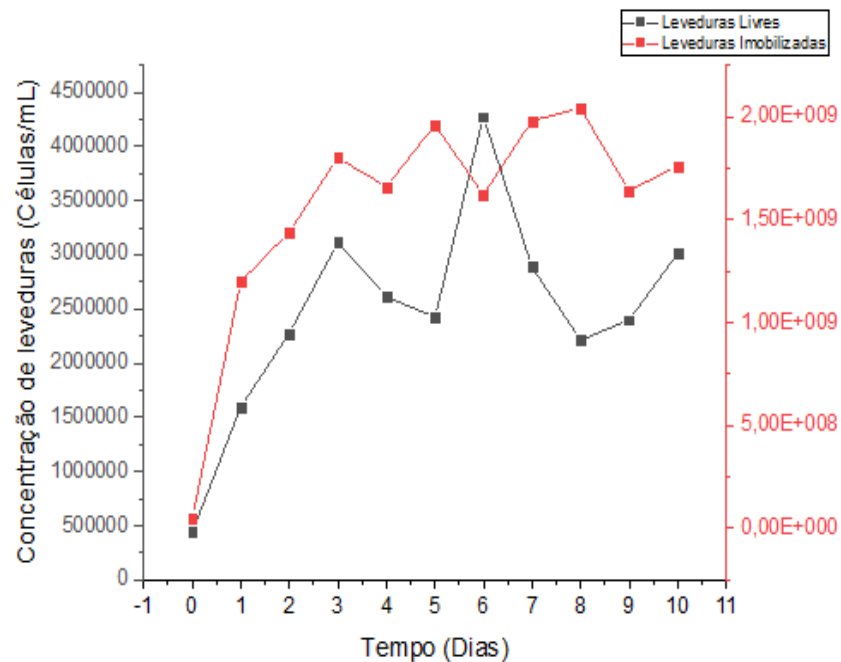
**Fonte: Autoria própria**

Até o terceiro dia de fermentação na sidra com leveduras livres resultou-se em um consumo de substrato de 17%, já na sidra com leveduras imobilizadas o consumo foi maior, de 29% de substrato. Após os três dias as duas sidras obtiveram-se um consumo igual de substrato, de 53%.

Para a produção de etanol, a sidra com leveduras imobilizadas atingiu um resultado maior e mais constante comparado com a sidra com leveduras livres (aproximadamente 26g/L e 20g/L). O mesmo resultado foi observado por Kassim (2012), relatando que esse efeito inibitório do etanol nas leveduras livres é menor quando as leveduras estão sendo protegidas no suporte. Sendo essa uma vantagem do método de encapsulação.

A concentração de células de leveduras também foi verificada nas duas sidras (Gráfico 14). Comentou-se no item 4.2.3 uma hipótese de que o resultado da concentração de leveduras não foi bem-sucedida pois não houve uma interação adequada entre as esferas de alginato de cálcio e o meio líquido. Por tanto, nas sidras as esferas foram colocadas dentro de uma rede, para ficarem no meio do balde fermentador, e ainda, sempre quando eram retiradas as esferas para contagens das células a cada 24 horas, essas esferas eram agitadas.

**Gráfico 14 - Concentração de Leveduras na Sidra Utilizando Leveduras Livres e Imobilizadas Durante Dez Dias**



**Fonte: Autoria própria**

Com o Gráfico 14, percebe-se que a concentração de leveduras na sidra com leveduras livre foi muito menor, chegando no máximo até  $4 \times 10^6$ , e na sidra com leveduras imobilizadas até  $2 \times 10^9$ . No começo da fermentação da sidra com leveduras imobilizadas ocorre um aumento mais rápido de células, assim como no Gráfico 13b, até o terceiro dia, o consumo de substrato foi maior.

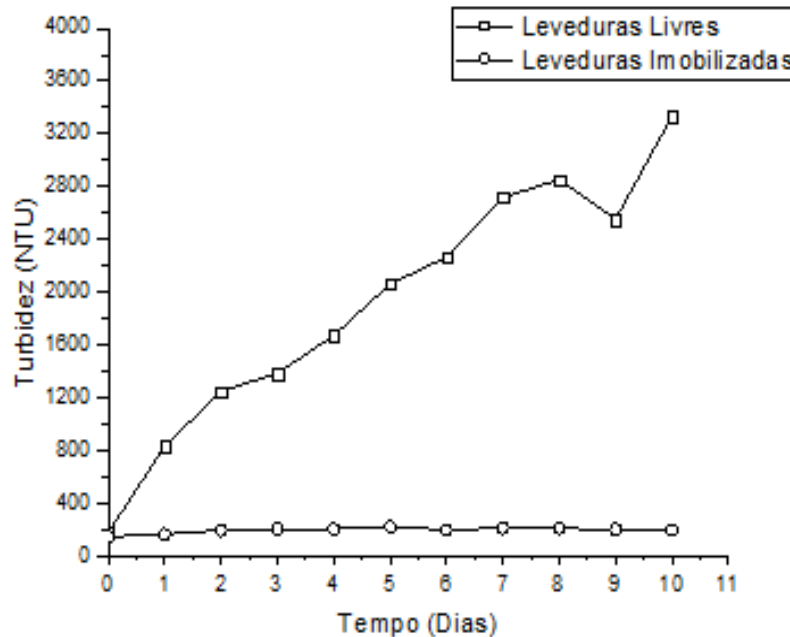
Também se observa que os resultados da concentração de leveduras na sidra com leveduras imobilizadas foram mais constantes comparado com os resultados do Gráfico 12. Assim, para conseguir quantificar as leveduras nas esferas de alginato de cálcio é necessário certificar-se de que as esferas estão em contato com o meio líquido.

#### 4.3.2 Turbidez e Coloração

Segundo Chanel (2003) e o Instituto Francês de Produtos da Cidreira a turbidez ideal para a sidra é de 0-50 NTU, sendo 50 NTU um líquido ligeiramente turvo e 10 NTU um líquido límpido. Assim realizou-se a turbidez na sidra com as leveduras imobilizadas e livres durante dez dias de fermentação para compará-las (Gráfico 15).



**Gráfico 15 - Turbidez Durante Dez Dias de Fermentação Alcoólica com Leveduras Livres e Imobilizadas na Sidra**



Fonte: Autoria própria

Como já demonstrado no Gráfico 9, a turbidez com leveduras livres é maior e crescente comparada com as leveduras imobilizadas, pois está relacionada com o aumento de leveduras no meio. Na sidra com leveduras imobilizadas começou com a turbidez de 153 NTU e aumento para 202 NTU em dois dias de fermentação e depois manteve-se constante. Esse aumento pode ser causado pelos polifenóis no meio (ZURIARRAINS, 2014).

A sidra começou com uma turbidez acima do ideal pois no suco de maçã *in natura* utilizado no estudo havia bastante sedimentos na garrafa. Mas se fosse realizado um processo de clarificação nesse suco, a turbidez poderia estar dentro da faixa ideal mesmo com um pequeno aumento durante o processo. Isso resultaria na eliminação do processo de filtração/purificação no final da fermentação, o que com o sistema tradicional (leveduras livres) é sempre necessário.

A cor é a primeira propriedade sensorial percebida durante a degustação da sidra como também é uma avaliação para novos consumidores (IFPC, 2017). A cor na sidra depende da quantidade de polifenóis presentes no suco, da quantidade de oxigênio disponível e também da quantidade da enzima polifenoloxidasas (PPO) (BAUDUIN, 2019). Assim verificou-se a coloração da sidra no início e no término da fermentação, com leveduras livres e imobilizadas (Tabela 2).

**Tabela 2 - Valores Médios dos Parâmetros L\*, a\* e b\* da Sidra no Início e Término da Fermentação na Sidra**

Parâmetros	Tempo (Dias)	Leveduras Livres	Leveduras Imobilizadas
L*	0	25,7166±0,0120 <sup>a</sup>	25,6766±0,0260 <sup>a</sup>
	10	27,0566±0,0606 <sup>b</sup>	26,1300±0,1123 <sup>b</sup>
a*	0	0,1800±0,0763 <sup>a</sup>	0±0,0556 <sup>a</sup>
	10	0,2266±0,0569 <sup>b</sup>	-0,2433±0,1361 <sup>a</sup>
b*	0	0,5933±0,0896 <sup>a</sup>	0,3633±0,0817 <sup>a</sup>
	10	-0,7200±0,0986 <sup>b</sup>	0,2433±0,1361 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os parâmetros L\*, a\* e b\* (Teste de Tukey, p<0,05)

**Fonte: Autoria própria**

O parâmetro L\* apresentou uma diferença significativa entre o início e término nas duas sidras. Esse parâmetro verifica a luminosidade do meio, que varia do preto ao branco, logo, como os valores nas duas fermentações aumentaram, demonstra que o meio ficou mais claro durante a fermentação.

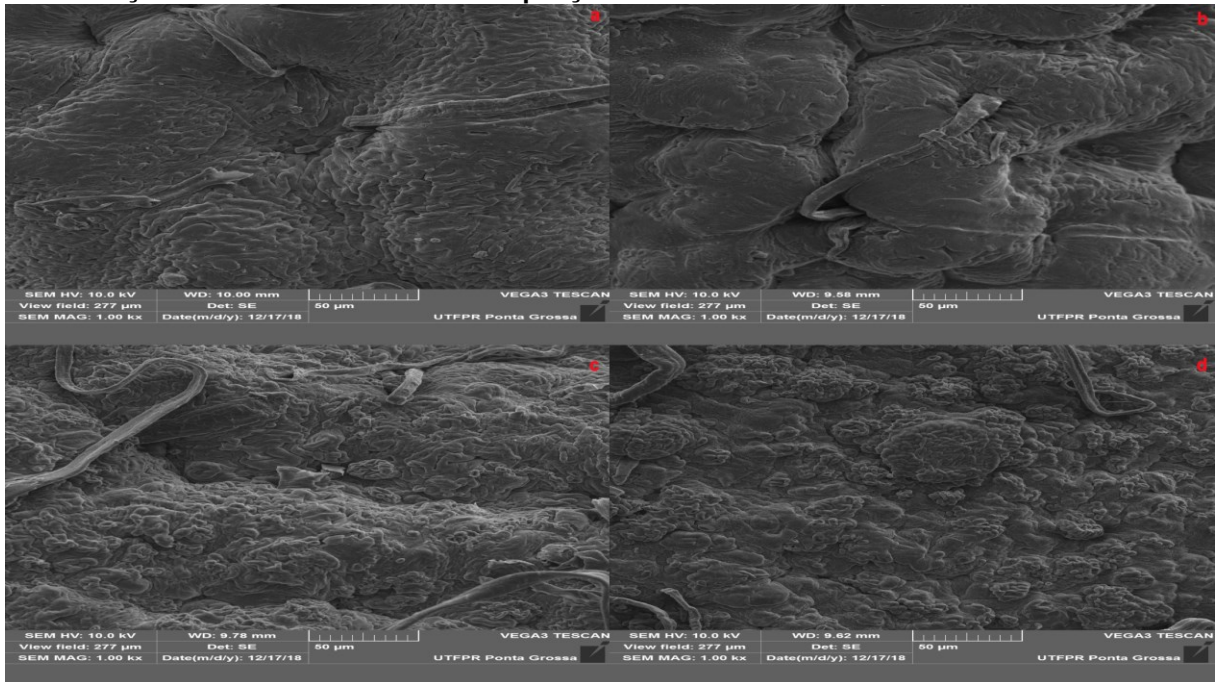
Observou-se que nos parâmetros a\* e b\* na sidra com leveduras livres ocorreu uma diferença significativa entre os tempos de fermentação. Para o parâmetro a\* houve uma tendência ao vermelho e para o b\* uma tendência menos amarela. Na sidra com leveduras imobilizadas não ocorreu uma diferença significativa nesses dois parâmetros.

A coloração da sidra pode ser relacionada com a turbidez do meio (Gráfico 15), pois na sidra com leveduras livres ocorreu uma variação maior para os três parâmetros da coloração (L\*, a\* e b\*), assim como houve um aumento da turbidez durante todo o processo de fermentação. E para a sidra com leveduras imobilizadas a turbidez aumentou no início da fermentação, mas depois manteve-se constante, não interferindo na coloração.

#### 4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens capturadas pelo MEV demonstram a morfologia da superfície das esferas de alginato de cálcio (Figura 18). Essas imagens foram observadas a cada 24 horas de fermentação alcoólica para analisar possíveis alterações durante o processo.

**Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Varredura nas Esferas de Alginato de Cálcio Durante a Fermentação Alcoólica na Sidra com Ampliação de 500x**



Legenda: a – 0 Horas, b – 24 Horas, c – 48 Horas, d – 72 horas

Fonte: **Autoria própria**

Observa-se que até 24 horas de fermentação na sidra (Figura 18a e 18b) as superfícies das esferas contêm algumas rugosidades, que podem ter sido ocasionadas durante a secagem das esferas, mas não se observa a presença de leveduras. Na Figura 18c, com 48 horas, a superfície da esfera está mais volumosa, o que indica o crescimento das células de leveduras dentro das esferas. Já com 72 horas, (Figura 18d) e até as 240 horas de fermentação da sidra (dez dias), é possível observar as leveduras na superfície das esferas.

Como já discutido nos itens anteriores, até o terceiro dia de fermentação na sidra com leveduras imobilizadas, foi relatado o maior consumo de substrato e um rápido crescimento celular, e através das imagens do MEV, conseguimos visualizar esses resultados.

## 5 CONCLUSÃO

Com os testes experimentais preliminares foi possível identificar 11 variáveis no método de encapsulação em alginato de cálcio na fermentação alcoólica. 8 dessas variáveis foram mantidas constantes e 3 foram estudadas. Com as concentrações adequadas do alginato de sódio, cloreto de cálcio e da concentração inicial de leveduras (3%, 3% e  $1 \times 10^7$  células/mL, respectivamente), aprimorou-se esse método, diminuindo os custos do processo de encapsulação de leveduras.

Os resultados obtidos das variáveis estudadas foram aplicados na sidra, conseguindo um aumento na produção de etanol e também conseguiu quantificar as leveduras encapsuladas. Houve uma relação entre a turbidez e a cor nas duas sidras, devido as leveduras livres no meio. A realização do MEV ajudou a observar e relacionar com os outros resultados do trabalho.

A comparação entre a fermentação alcoólica com leveduras livres e com as leveduras encapsuladas em alginato de cálcio essenciais para demonstrar as diferenças e vantagens entre eles.

Para estudos posteriores, sugere-se a comparação entre os compostos fenólicos das duas sidras, a realização de métodos para quantificar leveduras dentro das esferas de alginato de cálcio e a utilização de uma encapsulação híbrida.

## REFERÊNCIAS

ADELABU, B. A.; *et al.* Bioconversion of corn straw to ethanol by cellulolytic yeasts immobilized in *Mucuna urens* matrix. **Journal of King Saud University**, v. 31, n. 1, p. 136-141, 2019.

L'ASSOCIATION DES INDUSTRIES DES CIDRES ET VINS (AICV). **The European Cider e Fruit Wine Association: European Cider Trends 2017**, 2017.

AKIN, H.; *et al.* A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical engineering and Processing**, v. 47, p. 1986-1993, 2008.

ALCARDE, A. R. **Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica**. 2000. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

ALONSO, J. J. M. La sidra, trabajo em campo y procesos de transformación y industrialización. In: MINISTERIO DE EDUCACION Y CIENCIA DE ESPAÑA. **La transformación industrial de la producción agropecuaria**. Instituto Superior de Formación del Profesorado. Madrid: Solana y Hijos, 2004.

ANTOCE, A. O.; *et al.* Quantitative Study of Yeast Growth in the Presence of Added Ethanol and Methanol Using a Calorimetric Approach. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 664-669, 1997.

ASSIS, S. A; *et al.* Estabilização de enzimas: uma abordagem. **SITIENTIBUS: Série Ciências Biológicas, Bahia**, v. 10, n. 2, p. 195-200, 2010.

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, 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.

BATISTITE, M.; *et al.* Evaluating Carriers for Immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Production in a Continuous Column Reactor. **Ciência e Natura**, v. 32, n. 2, p. 83-95, 2010.

BAUDUIN, R. **Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC)**. Disponível em: <http://partage.cra-normandie.fr/fichiers/cidre-elaboration.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2019.

BENVENUTTI, L. **Avaliação da extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã com etanol para aplicação em sidra**. 2018. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

BENVENUTTI, L. Effect of addition of phenolic compounds recovered from apple pomace on cider quality, **Food Science and Technology**, v. 100, p. 348-353, 2019.

BERCHE, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 1-6, 2012.

BERTUZZI, A. S.; *et al.* Use of smear bacteria and yeasts to modify flavour and appearance of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 72, p 44-54, 2017.

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

BONASSA, G. *et al.* Análise da influência do pH e da temperatura no processo de fermentação de caldo de cana. *In*: ENCONTRO PARANAENSE DE ENGENHARIA E CIÊNCIA, 3., 2013, Toledo. **Anais [...]**. Toledo: UNIOESTE, 2013. p. 181-185.

CABRAL, B. V.; *et al.* Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. **Horizonte Científico**, v. 6, n. 2, 2012.

CARVALHO, R. F. **Fermentação alcoólica**. Disponível em: <http://revistaeletronicadequimica.blogspot.com/2010/05/fermentacao-alcoolica.html>. Acesso em: 26 jul. 2017.

CHA, H. G.; *et al.* Evaluating Carriers for Immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Production in a Continuous Column Reactor. **Mycobiology**, v. 42, n. 3, p. 249-255, 2014.

CHEETHAM, P. S. J.; *et al.* Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 2155-2168, 1979.

CHUNG, T. S.; LOH, K. C.; TAY, H. L. Development of polysulfone membranes for bacteria immobilization to remove phenol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 70, n. 13, p. 2585-2594, 1998.

COELHO, P. **Saccharomyces cerevisiae**. 2013. Disponível em: <http://www.engquimicasantosp.com.br/2013/09/saccharomyces-cerevisiae.html>. Acesso em: 26 jul. 2017.

CONCEIÇÃO, K. C.; *et al.* Imobilização por ligação covalente de peroxidase de raiz forte em sílicas mesoporosas. In: SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADESNTES, 16., 2014, Aracaju. **Anais [...]**. Aracaju: UNIT, 2014. p. 20-28.

CORAZZA, M. L.; *et al.* Preparação e caracterização do Vinho de Laranja. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

COSTA, L. P. **Alginates: Applications in the biomedical and food industries**. Beverly: Scrivener, 2019.

COUTINHO, A. **Conhecer o vinho**, 2017. Disponível em: <https://biologia12site.files.wordpress.com/2017/03/085-conhecer-o-vinho-anc3adbalcoutinho.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2017.

COVIZZI, L. G.; *et al.* Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143-160, jul/dez. 2007.

CULPI, T. A.; *et al.* Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de alginate de cálcio. **Visão Acadêmica**, v. 11, n.1, 2010.

DENG, Z.; *et al.* Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 691-699 2019.

DOBROWOLSKI, R.; *et al.* Extracellular polymeric substances immobilized on microspheres for removal of heavy metals from aqueous environment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 202-211, 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.

ELAKKIYAL, M.; PRABHAKARAN, D.; THIRUMARIMURUGAN, M. Methods of cell immobilization and its applications. **International Journal of Innovative Research in Science**, v. 5, n.4, 2016.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 30, n. 2, p. 361-380, abr./jun. 2009.

ETCHEPARE, M. A.; *et al.* Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostática. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 75-86, 2015.

FARBO, M. G.; *et al.* Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilized in calcium alginate beads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 29-34, 2015.

FARIA, S. F. F. **Obtenção de esferas de alginato com centro líquido: Desenvolvimento de novos produtos**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2013.

GARCIA, J. M.; *et al.* Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

GIESE, E. C. Potencial biotecnológico do uso de microrganismos imobilizados em gel de alginato de cálcio. **Série Tecnológica Ambiental CETEM**, p. 47, 2015.

GRONDIN, E.; *et al.* Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives. **Food Chemistry**, v. 237, p. 677-684, 2017.



GRUNHAGEN, T. Characterisation of the degrading properties of alginate under influence of citrate. **Biomedical engineering**, 2002.

GU, M.; *et al.* Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 283-289, 2019.

HELGERUD, T.; *et al.* Alginates, in Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, **Alan Imeson**, p. 50-72, 2010.

INSTITUT FRANÇAIS DES PRODUCTIONS CIDRICOLES (IFPC). **Des cidres et des couleurs**. 2017. Disponível em: <http://www.ifpc.eu/infos-techniques.html>. Acesso em: 10 fev. 2019.

JANSSEN, L. J. J. M.; BOERSMA, A.; NIJENHUIS, K. Encapsulation by interfacial polycondensation. III. Microencapsulation; the influence of process conditions on wall permeability. **Journal of Membrane Science**, v. 79, n. 1, p. 11-26, 1992.

JIMÉNEZ, M. V.; *et al.* Efecto de diámetro de esfera y densidade celular em la producción de etanol com levadura inmovilizada em alginato. **Revista Colombiana de Biotecnología**. Bogotá, v. 13, n. 1. 2011.

JUNIOR, W. C. S. **Imobilização de células permeabilidade de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

KARAMANOU, M.; *et al.* Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): Father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. **Revista argentina de microbiología**, v. 42, n. 4, p. 311-314, 2010.

KASSIM, C. **Vinification continue avec levures immobilisées**: Analyse du système et conception du réacteur industriel. 2012. 201 F. Tese (Doutorado) - Université de Toulouse, Toulouse, 2012.

KATAM, K.; BHATTACHARYYA, D. Simultaneous treatment of domestic wastewater and biolipid synthesis using immobilized and suspended cultures of microalgae and activated sludge. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 69, p. 295-303, 2019.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, 2008.

KOSTOV, G. *et al.* Mechanical properties of ca-alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast. **Revue de genie Industriel**, v. 5, p. 25-35, 2010.

KOVALESKI, G. Aplicações da imobilização celular de leveduras utilizando o método de alginate de cálcio. **XI Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, Londrina, 2017.

KURADE, M. B.; *et al.* Decolorization of textile industry effluent using immobilized consortium cells in upflow fixed bed reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 213, p. 884-891, 2019.

LABACVET. **Laboratório de bacteriologia veterinária**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/?q=node/13>. Acesso em: 13 jul. 2017.

LE, H. D. T.; LE, V. V. M. Effects of initial pH value of the medium on the alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on nipa leaf sheath pieces. **Songklanakarin Journal of science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 663-667, 2014.

LEE, B. B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E. S. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. **Chemical Engineering Technology**, v. 36, n. 10, p. 1627-1627, 2013.

LEE, P.; ROGERS, M. A. Effect of calcium source and exposure-time on basic caviar spherification using sodium alginate. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 1, n. 2, p. 96-10, 2012.

LEE, S. Y.; *et al.* A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped Na-Y zeolite: Recirculating packed bed disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 210-216, 2019.

LEO, W. J.; MCLOUGHLIN, A. J.; MALONE, D. M. Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 1, p. 51-53, 1990.

LI, Q.; *et al.* Synergic effect of adsorption and biodegradation enhance cyanide removal by immobilized *Alcaligenes* sp. strain DN25. **Journal of Hazardous Materials**, v. 326, p. 367-375, 2019.

LI, Z.; *et al.* Study on shape optimization of calcium alginate beads. **Advanced Materials Research**, v. 648, p. 125-130, 2013.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIU, J.; *et al.* Enhancement of *Monascus* pigment productivity via a simultaneous fermentation process and separation system using immobilized-cell fermentation. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 552-560, 2019.

LO, H. J.; *et al.* Fruits as the vehicle of drug resistant pathogenic yeasts. **Journal of Infection**, v. 75, n. 3, p. 254-262, 2017.

MANFIO, G. P. **Microbiota: microrganismos**. p. 113-145. 2003 Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/Aval\\_Conhec\\_Cap2.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/Aval_Conhec_Cap2.pdf). Acesso em: 13 jul. 2017.

MARIE, H. **Influence des fermentations alcoolique et malolactique sur la composition chimique des cidres à distiller en cours d'élaboration**. 2011. 209 f. Tese (Doutorado) - Universite de Caen Basse-Normandie, Caen, 2011.

MARQUES, W. L.; *et al.* Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, 2016.

MASLOVA, O. *et al.* Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF). **Bioresource Technology**, v. 272, p. 1-9, 2019.

MELO, H. F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MONTEIRO, S.; *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 239-247, 1993.

MULLER, J. M.; *et al.* Produção de alginate por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n. 4, 2011.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, p. 251-260, 2003

NEDOVIC, V. A.; *et al.* Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeasts. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 17-22, mar. 2001.

NEDOVIC, V.; *et al.* Continuous cider fermentation with co immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 834-839, 2000.

NORTON, S.; WATSON, K.; D'AMORE, T. Ethanol tolerance of immobilized brewers yeast cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 18-24, 1995.

OLIVEIRA, A. F.; *et al.* *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p.110-120, 2019.

OLIVEIRA, G.; *et al.* **Microbiologia**. Instituto Federal de Educação Ciência Tecnologia. 2012

OLIVEIRA, L. M. C.; CLEMENTE, M. A. C. P. Port wine spectrophotometry. **Optics & Laser Technology**, v. 45, n. 6, p. 491-496, 2003.

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.

PALLERONI, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 1, p. 3-19, jul. 1997.

PAULINO, G. V. B.; *et al.* Diversity of culturable yeasts associated with zoanthids from Brazilian reef and its relation with anthropogenic disturbance. **Marine Pollution Bulletin**, v. 123, p. 253-260, out. 2017.

PICINELLI, A. *et al.* Chemical characterization of Asturian Cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3997- 4002, 2000.

QUALI. **Microbiologia: fungos (leveduras)**. 2016. Disponível em: <http://www.quali.pt/microbiologia/582-fungos-leveduras-saccharomyces>. Acesso em: 25 jul. 2017.

REHN, G.; *et al.* Chitosan flocculation: Na effective method for immobilization of *E. coli* for biocatalytic processes. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 138-144, 2013.

REUSS R. M.; STRATTON J. E.; SMITH D. A. Malolactic fermentation as a technique for the deacidification of hard apple cider. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 74-78, 2010.

ROCHA, F. G.; PUJOL, A. F. T. Cultivo de macieras e produção de sidra com denominação de prigem protegida no principado das Astúrias, Espanha. **Geografia Agrária**, p. 187-205, 2013.

SAMSON, R. A.; *et al.* Culture Collections to Improve the Quality of life. **The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures**, p. 111-114, 1996.

SÁNCHEZ, M. C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANONER, P.; *et al.* Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4847-4853, 1999.

SCOTT, C. D. Fluidized-Bed bioreactors using a flocculating strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 413, p.448-456, 1983.

SCOTT, C. D. Immobilized cells: a review of recent literature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 2, p. 66-72, 1987.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL (SENAI). **Industrialização de Bebidas**. São Paulo: SENAI-SP, 2014.

SERP, D.; *et al.* Characterization of na encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, p. 41-53, 2000.

SERP, D.; *et al.* Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca alginate beads. **Biotechnology and bioengineering**, v. 79, n.3, ago. 2002.

SINGH, B.; *et al.* Degradation of fermentation inhibitors from lignocellulosic hydrolysate liquor using immobilized bacterium, *Bordetella* sp. BTIITR. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n.1, p. 1152-1160, 2019.

TACIN, M. V. **Imobilização da enzima álcool desidrogenase em suportes alginato-quitosana e glioxil-agarose**. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. **Immobilized cells: principles and applications**. Cambridge University, 1988.

THU, B.; SMIDSDROD, O.; BREAK, G. S. Alginate gels – Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. **Trends Biotechnology**, v. 8, n.3, p. 19-30, 1990.

VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Geral**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. 2012. Disponível em: [http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico\\_acucar\\_alcool/microbiologia\\_geral.pdf](http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_geral.pdf). Acesso em: 13 jul. 2017.

WILLAERT, R. G. Fermentation Microbiology and Biotechnology. In: WILLAERT, R. G. **Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology**: Current Trends and Future Prospects. 3. ed. 2011, p. 313-366.

WILLIAMS, D.; *et al.* The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1813-1825, 1981.

WOO, J. W.; *et al.* Sphericity Optimization of Calcium Alginate Gel Beads and the Effects of Processing Conditions on Their Physical Properties. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 715-721, 2007.

XIANGLIANG, P.; JIANLONG, W.; DAOYONG, Z. Biosorption of Pb (II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2799-2803, 2005.

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 2951-2957, 2014.

ZATTERA, T. C.; *et al.* Estudo das potencialidades da aplicação de leveduras encapsuladas para elaboração de vinhos espumantes. In: MOSTRA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR, 8., 2015, Santa Rosa do Sul. **Anais** [...]. Santa Rosa do Sul: IFC, 2015. p. 1-5.

ZURIARRAIN, A.; *et al.* Polyphenolic profile in cider and antioxidant power. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 14, p. 2931-2943, 2014.