



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PPG - BIONORTE

**UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NATURALMENTE OCORRENTE NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS DE
FRUTOS AMAZONICOS APLICADAS NA PRODUÇÃO DE
AGUARDENTE**

RUBENS MENEZES GOBIRA

BELÉM - PA
2021

RUBENS MENEZES GOBIRA

**UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NATURALMENTE OCORRENTE NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS DE
FRUTOS AMAZÔNICOS APLICADAS NA PRODUÇÃO DE
AGUARDENTE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Pará - UFPA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Alberdan Silva Santos

BELÉM - PA
Dezembro/2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G575u Gobira, Rubens Menezes.
Utilização de leveduras naturalmente ocorrente na
biotransformação de açúcares fermentescíveis de frutos amazônicos
aplicadas na produção de aguardente / Rubens Menezes Gobira. —
2021.
94 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Alberdan Silva Santos
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2021.

1. Leveduras. 2. Fermentação Alcoólica. 3. Mangífera
indica L. 4. Aguardente. I. Título.

CDD 660.6

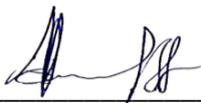
RUBENS MENEZES GOBIRA

**UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NATURALMENTE OCORRENTE NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS DE
FRUTOS AMAZONICOS APLICADAS NA PRODUÇÃO DE
AGUARDENTE**

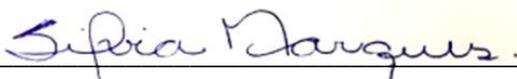
Tese de doutorado apresentada ao de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Pará - UFPA, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 15/12/2021

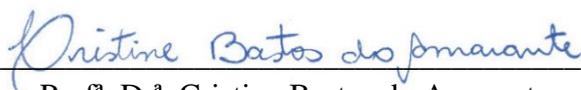
BANCA EXAMINADORA



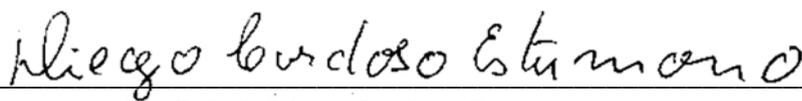
Prof^o. Dr^o. Alberdan Silva Santos



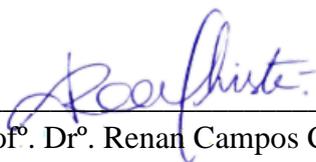
Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Marques Da Silva



Prof^a. Dr^a. Cristine Bastos do Amarante



Prof^o. Dr^o. Diego Cardoso Estumano



Prof^o. Dr^o. Renan Campos Chisté

BELÉM -PA
Dezembro/2021

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus por ter me permitido chegar até esse momento tão importante na minha vida, também agradeço a minha esposa Patrícia Gobira por ter me incentivado e sempre me apoiado em todos os momentos durante toda essa batalha e aos meus filhos Júlia e Vinícius por terem entendido a minha ausência no período do doutorado, agradeço também aos meus pais Luiz Gobira e Zuleide Menezes pelo apoio, a minha sogra Maria da Cruz por todas as vezes que precisamos e ela se disponibilizou a nos ajudar com as crianças para que pudesse exercer várias atividades desse doutorado.

Assim como também agradeço a instituições que foram muito importantes para a execução dessa tese: UFPA (ao meu Orientador Prof^o. Dr^o. Alberdan Silva Santos que com todo o seu conhecimento orientou-me de forma intensa e sábia, aos meus colegas do LABSISBIO por todos os cafés, lanches, reuniões, seminários, risos e choros também devem ser lembrados); Museu Emilio Goeldi (onde tive a oportunidade de trabalhar com a Prof^a. Eloisa Helena na extração de óleos e aromas, e também tive a oportunidade de conviver com a paciente ajuda e a orientação do nosso antigo secretário Oberdan.) UNOESTE (pelo apoio através da Prof^a. Dra. Adriana Moro por análises cedidas a minha tese) INSTITUTO EVANDO CHAGAS (onde executei uma parte importante da minha tese sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Silvia Helena onde também tive a oportunidade de conhecer alunos e técnicos como Ruan nosso mestre do DNA, o ALEX nosso mestre do sequenciamento, Elaine, Jordana, Gardene onde trabalhamos muito, rimos muito e nos frustramos muito quando não tínhamos êxitos com alguns de nossas (filhas) que era como intitulávamos nossos fungos e leveduras.

No mais, tive o imenso prazer de ter também feito amigos que tenho absoluta certeza que ficarão para a vida toda como o Ricardo e família, Wandson e família, Dr^o. Hugo e família, Prof^o. Dr^o. Agenor, Prof^o. Dr^o. Nelson sua esposa Adriana e sua filha Alice, Cristina e Dona Maria José, as duas últimas, esposa e mãe do meu orientador, que muito se preocupavam com toda minha família, e também não poderia esquecer-me do seu DICO, tio do meu orientador, por nossas longas conversas, conselhos e risos.

No mais saio desse doutorado com conhecimento não só de um trabalho realizado entre essas páginas, mas também com um conhecimento para a vida, pois passamos muito tempo longe da família e amigos, mas eu tive um grande prazer e a sorte de poder trabalhar boa parte da produção desta tese com o apoio, ajuda o carinho, puxadas de orelha e todo amor da minha esposa. Não poderia ter um esteio melhor do que esse ao meu lado, portanto essa tese é dedicada principalmente a ela e nossos filhos por estarmos vencendo juntos e bem juntos.

PATRICA, JÚLIA E VINÍCIUS GOBIRA vocês são o motivo de eu estar aqui hoje, o nosso amor é maior que tudo, e como o Padre nos disse (NA ALEGRIA E NA TRISTEZA, NA SAÚDE E NA DOENÇA, ATÉ QUE A MORTE NOS SEPARE, AMÉM) AMO VOCES!

GOBIRA, Rubens Menezes. Utilização de leveduras naturalmente ocorrente na biotransformação de açúcares fermentescíveis de frutos amazônicos aplicadas na produção de aguardente. 2021. 96f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2021.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo estudar a microbiota presente na polpa de manga (*Mangifera indica* L. var. Bacuri) e verificar seu potencial sobre a fonte de carboidrato desta variedade para produção de aguardente. As leveduras foram isoladas e identificadas durante a fermentação espontânea da polpa de manga (*Mangifera indica* L. var. bacuri) para estudar o perfil microbiano na busca de cepas de leveduras novas ou conhecidas, com potencial de fermentar açúcares de frutas exóticas para gerar aguardente; fazendo uso de técnicas de análise micro-estruturais e morfológicas, e técnicas moleculares para identificação, como a caracterização dessas leveduras quanto ao perfil de assimilação de carbono. Também se buscou conhecer as características químicas da polpa para viabilizar a produção de aguardente, sendo analisados os principais parâmetros que conferem qualidade durante a fermentação: teor de água, açúcares redutores totais, rendimento da hidrólise, voláteis totais, composição centesimal de fibras e teor de álcool. Foram caracterizadas quanto a acidez expressa em gramas de ácido cítrico, sólidos solúveis totais (SST) expressa em °Brix, açúcares redutores totais, pH, composição química expressa em base de matéria seca, composição volátil e composição de açúcares fermentescíveis; as duas últimas foram analisadas por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas GC/MS. A quantificação da aguardente será executada por um método adaptado por infravermelho. A extração de aromas, tanto da polpa do fruto quanto do produto será executada por SDE (EDS-Extração por destilação simultânea). Da seleção de leveduras foi possível uma alta identidade com representantes de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida haemulonii*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Meyerozyma guilliermondii*. Essa variedade apresentou resultados incluídos no estabelecido pelo Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Manga. Na análise de composição volátil, obteve-se o α -terpinoleno e na de açúcares se obteve a sacarose como substâncias majoritárias.

Palavras-chaves: Leveduras; Fermentação Alcoólica; *Mangifera indica* L.; Aguardente.

GOBIRA, Rubens Menezes. Use of naturally occurring yeasts in the biotransformation of fermentable sugars from Amazonian fruits applied in the production of brandy. 2021. 96f. Thesis (Ph.D. in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Pará, Belém, 2021.

ABSTRACT

The objective of this work is to study the microbiota present in mango pulp (*Mangifera indica* L. var. Bacuri) and to verify its potential on the carbohydrate source of this variety for the production of brandy. Yeasts were isolated and identified during the spontaneous fermentation of mango pulp (*Mangifera indica* L. var. bacuri) to study the microbial profile in search of new or known yeast strains with the potential to ferment exotic fruit sugars to generate brandy; making use of micro-structural and morphological analysis techniques, and molecular techniques for identification, such as the characterization of these yeasts regarding their carbon assimilation profile. We also sought to know the chemical characteristics of the pulp to enable the production of brandy, analyzing the main parameters that provide quality during fermentation: water content, total reducing sugars, hydrolysis yield, total volatiles, centesimal composition of fibers and content of alcohol. They were characterized in terms of acidity expressed in grams of citric acid, total soluble solids (TSS) expressed in °Brix, total reducing sugars, pH, chemical composition expressed as dry matter, volatile composition and fermentable sugar composition; the last two were analyzed by Gas Chromatography coupled with GC/MS Mass Spectrometry. They were characterized in terms of acidity expressed in grams of citric acid, total soluble solids (TSS) expressed in °Brix, total reducing sugars, pH, chemical composition expressed as dry matter, volatile composition and fermentable sugar composition; the last two were analyzed by Gas Chromatography coupled with GC/MS Mass Spectrometry. The quantification of the brandy will be carried out by a method adapted by infrared. The extraction of aromas, both from the pulp of the fruit and the product will be performed by SDE (EDS-Extraction by simultaneous distillation). From the selection of yeasts, a high identity was possible with representatives of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida haemulonii*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Meyerozyma guilliermondii*. This variety presented results included in the established by the Technical Regulation for Establishing Identity and Quality Standards for Mango Pulp. In the analysis of volatile composition, α -terpinolene was obtained, and in the sugar analysis, sucrose was obtained as the major substances.

Key-words: Yeasts; Alcoholic Fermentation; *Mangifera indica* L.; Spirits.

LISTA DE FIGURAS**Apresentação**

Figura 1 - Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*. **21**

Capítulo 1

Figura 1- A-Árvore de *M. indica*, B-Flores, C - Frutos da Manga. **26**

Figura 2 - Contribuição das mangueiras para regulação do microclima, melhoria da qualidade do ar, fornecimento de sombra e bem-estar físico. **30**

Figura 3 - Diversidade de áreas que envolvem a biotecnologia das leveduras. **37**

Capítulo 2

Figura 1 - Perfil Cromatográfico dos carboidratos da manga bacuri. **53**

Figura 2 - Cromatograma dos Compostos Voláteis da Manga Bacuri. **54**

Figura 3 - Cromatogramas: padrão de β -caroteno (A); extrato obtido da polpa (B). **56**

Capítulo 3

Figura 1 - Morfologia da colônia e características observadas a partir das leveduras recuperadas **69**

Figura 2 - Análise Filogenética Molecular pelo Método da Máxima Verossimilhança **72**

Capítulo 4

Figura 1 - Espectros de infravermelho das soluções padrão e etanol obtido do mosto fermentado da manga por destilação **85**

LISTA DE TABELAS E QUADRO**Capítulo 1**

Quadro 1 - Descrição das variedades de manga.	30
Tabela 1 - Composição centesimal da casca e da polpa de manga (g/100g).	33
Tabela 2 - Caracterização físico química.	34
Tabela 3 - Estádios de maturação definidos em função das características da casca e da polpa da manga “Tommy”.	34
Tabela 4 - Teor de minerais da casca e da polpa de manga Tommy (mg/100g).	35

Capítulo 2

Tabela 1 - Tabela de Caracterização da Polpa da Manga.	50
Tabela 2 - Produção de manga no Brasil, nas suas regiões e principais Estados.	51
Tabela 3 - Composição Química, na base de matéria seca da manga bacuri.	52
Tabela 4 - Composição de açúcares da manga bacuri.	53
Tabela 5 - Composição Volátil da manga variedade bacuri.	54

Capítulo 3

Tabela 1 - Identificação da levedura no GenBank	70
Tabela 2 - Perfil bioquímico da levedura de polpa de manga recuperada, avaliada pelo sistema automático VITEK 2	75

Capítulo 4

Tabela 1 - Tabela de Caracterização	85
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Açúcar Redutor Total
ATT	Acidez Total Titulável
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DBO	Demanda Bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	Fibra de Detergente Ácida
FDN	Fibra de Detergente Neutra
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
GC/MS	Gas chromatography/mass spectro
GPY	Glucose Peptone Yeast Extract
GRAS	Generally Recognized As Safe
ITS	Internal Transcribed Spacer
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MIBA	Microrganismo de Interesse Biotecnológico da Amazônia
MM	Matéria Mineral
MS	Matéria Seca
NDT	Nutrientes Digestivos Totais
Pb	Pares de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDE	Silmultaneous Distillation Extract
SPME	Solid Phase Micro Extration
SST	Sólidos Soluveis Totais
TE	Tampão Tris/Edta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. OBJETIVOS	14
1.1.1. Objetivo geral	14
1.1.2. Objetivos específicos	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. BEBIDAS ALCOÓLICAS E SUAS IMPORTÂNCIAS NA SOCIEDADE.....	14
2.2. FONTES DE MATÉRIAS – PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS.....	16
2.3. PROCESSOS DE FERMENTAÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS.....	17
2.4. LEVEDURAS PARA USO EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	20
2.5. FRUTAS E SEUS POTENCIAIS NA GERAÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS	22
2.6. MANGA COMO FONTE DE MATÉRIA-PRIMA PARA GERAÇÃO DE AGUARDENTE.....	24
2.7. PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS E ECONÔMICAS DE AGUARDENTE DE MANGA.....	25
CAPÍTULO 1 - Aspectos Ambientais, Econômicos e Biotecnológicos da Polpa do Fruto de <i>Mangifera indica</i> L.	26
1. ASPECTOS BOTÂNICOS	26
2. ASPECTOS HISTÓRICOS, ORIGEM E DISSEMINAÇÃO.....	27
3. ASPECTOS ORNAMENTAIS.....	28
4. ASPECTOS ALIMENTÍCIO, ECONÔMICOS E AMBIENTAIS	31
5. ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS E FONTE DE PRODUTOS.....	36
6. PERSPECTIVAS.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO 2 - Caracterização da polpa de <i>Mangifera Indica</i> L. (var. Bacuri) para produção de Aguardente aromatizada	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 COLHEITA DO MATERIAL BOTÂNICO	45
2.2 PROCESSAMENTO DO FRUTO E OBTENÇÃO DA POLPA	46

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA	46
2.3.1 Acidez Total Titulável (ATT)	46
2.3.2 Determinação de Sólidos Solúveis Totais (SST)	46
2.3.3 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)	47
2.3.4 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH).....	47
2.3.5 Determinação do Teor de Água.....	47
2.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA EXPRESSOS NA BASE DE MATÉRIA SECA.....	47
2.5. EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS.....	48
2.6. DERIVATIZAÇÃO DE AÇÚCARES ASSISTIDA POR MICROONDAS	48
2.7. ANÁLISE DO PERFIL DOS AÇÚCARES E SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS POR GC/MS.....	48
2.8. ANÁLISE DO PERFIL DE CAROTENOIDES DA POLPA HPLC-DAD.....	48
2.8.1 Preparação das amostras	49
2.8.1.1 Amostra do padrão de β -caroteno.....	49
2.8.1.2 Amostra da polpa de manga.....	49
2.8.2 Análise por HPLC-DAD	49
2.9. IDENTIFICAÇÃO DOS CAROTENOIDES.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4. CONCLUSÕES.....	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO 3 - Isolamento e identificação molecular de leveduras naturalmente ocorrentes em polpa de <i>Mangifera indica</i> L. var. Bacuri	63
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 ISOLAMENTO, SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS.....	66
2.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS	67
2.2.1 Extração de DNA de leveduras.....	67
2.2.2 Amplificação de DNA por código de barras	67
2.2.3 Sequenciamento genético	68
2.2.4 Reconstrução filogenética	68
2.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1 ISOLAMENTO, SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS.....	69

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR SEQUENCIAÇÃO DE LEVEDURAS	70
3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	73
4. CONCLUSÕES.....	77
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
CAPÍTULO 4 - Desenvolvimento de Método Analítico, por Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio e Calibração Multivariada, para Quantificação do Teor de Etanol obtido na Fermentação da Polpa de Manga (mangifera indica l.) Variedade bacuri.....	81
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. METODOLOGIAS.....	83
2.1 A COLETA DO MATERIAL	83
2.2 PROCESSAMENTO, POLPAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA POLPA E DO MATERIAL FERMENTADO	83
2.3 PREPARAÇÃO DA POLPA DE MANGA PARA A FERMENTAÇÃO.....	83
2.4 FERMENTAÇÃO	83
2.5 DESTILAÇÃO	84
2.6 QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL POR ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO MÉDIO.....	84
2.6.1 Tratamento dos dados espectrais e quantificação da construção do modelo por mínimos quadrados parciais (PLS)	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4. CONCLUSÕES.....	86
5. REFERÊNCIAS.....	87
CONCLUSÃO FINAL	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO GERAL

A obtenção de álcool de fontes renováveis tem sido alvo na obtenção de bebidas alcoólicas e produtos derivados, em função da preservação ambiental e envolvimento da agricultura familiar, assim como aumento da qualidade dos produtos e melhoria do valor de mercado, constituindo assim um importante setor da indústria alcooleira. Este nicho de mercado se apresenta como uma alternativa quando a fonte de matéria prima passa a ser resíduo ou produtos agroindústrias que não apresentam potencial de mercado, mas que podem ser transformados para a geração de produtos nobres. Neste seguimento, a inovação envolvendo tecnologia de transformação e o envolvimento de perspectivas de geração de processo, produto e a minimização do impacto ambiental, associado a geração de renda se apresenta como alvo deste trabalho. Dentro deste aspecto, a investigação de técnicas de fermentações aplicadas a uma matéria prima de fácil acesso e que possibilite um processo economicamente viável é o foco deste trabalho, e por isso, busca-se usar mangas de variedade Bacuri (*Mangifera indica L.*), em função de possuir grande abundância na região Amazônica e baixo valor de mercado, assim como sua demanda sazonal poderá ser aproveitada para a geração de um produto nobre, constituindo assim uma fonte de matéria-prima para biotransformações de seus açúcares em álcool, usando-se leveduras naturalmente ocorrentes como sistema adaptados especificamente para produção de aguardente. Em geral, manga desta espécie apresenta polpa rica em açúcares fermentescível e um potencial aromático que permitirá realizar um processo para geração de aguardente possuindo aroma que poderá se apresentar como um produto inovador de potencial tecnológico e econômico. Através dos objetivos será possível verificar se a utilização de polpa de manga Bacuri (*Mangifera indica L.*) com correção da concentração de sólidos solúveis que representam os açúcares fermentescíveis e a utilização de micro-organismos naturalmente ocorrente no processo de fermentação alcoólico poderá apresentar potencial para produção de aguardente com aroma característico e produtividades aceitáveis para um processo tecnológico.

Este projeto será realizado na Universidade Federal do Pará, no Instituto de Ciências Exatas e Naturais, nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular. O trabalho está dividido em capítulos: ***O primeiro capítulo*** é feito uma breve e sucinta abordagem da importância econômica e cultura da manga, bem como suas perspectivas de aplicações biotecnológicas. ***O segundo capítulo*** trata da caracterização química do material botânico utilizado, onde são estudadas fibras, compostos voláteis como

os aromas e constituição de açúcares fermentescíveis, utilizando técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas, assim com uma visão da produção e comercialização de algumas variedades no mercado nacional e internacional. **O terceiro capítulo** é apresentado os resultados do isolamento de leveduras e sua identificação. Descreve-se o processo de isolamento a partir da fermentação espontânea da polpa de *Mangifera indica* L., caracterização macroscópica das leveduras isoladas e a identificação molecular através do sequenciamento da região ITS das leveduras fermentativas. **O quarto capítulo** apresenta o ensaio de fermentação da manga para produção de álcool, em escala de laboratório, utilizando para destilação coluna de vidro, para o desenvolvimento de um método analítico de quantificação de álcool por infravermelho.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

Realizar estudo na polpa de manga (*Mangifera Indica* L), variedade Bacuri visando seu potencial com matéria-prima para produção de aguardente aromatizada, utilizando leveduras naturalmente ocorrentes e/ou leveduras comerciais.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Isolar, selecionar e preservar as leveduras naturalmente ocorrentes na polpa de manga;
- Identificar as leveduras que apresentam potencial de fermentação com técnicas de análises morfológicas e micro-estruturais, e por técnicas da biologia molecular a partir das regiões do ITS;
- Investigar o potencial de açúcares fermentescível após sacarificação dos polissacarídeos presentes na polpa de manga com leveduras comerciais;
- Investigar o potencial da polpa de manga quanto ao teor de açúcares fermentescível;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bebidas alcoólicas e suas importâncias na sociedade

A elaboração de bebidas alcoólicas é um dos mais antigos processos que acompanha as civilizações, tendo, ao que tudo indica, sido iniciada com a produção de vinhos e cervejas há milhares de anos (VENTURINI FILHO, 2010).

As bebidas fermento-destiladas, como as aguardentes de fruta, têm como principal característica o teor alcoólico bem superior ao de bebidas fermentadas, não destiladas. Além do etanol, outras substâncias estão presentes e são os principais responsáveis pelo sabor característico destas bebidas, apesar de se encontrarem em concentrações baixas. Em geral, essas substâncias voláteis, que diferenciam e definem as características organolépticas das diversas bebidas fermento-destiladas; podendo também os taninos e outros fenólicos, os quais não são voláteis, conferirem aromas, sabores e cores determinantes da qualidade destes produtos (JANZANTTI, 2004).

Segundo o Ministério da Agricultura, a aguardente de fruta é a bebida com graduação alcoólica de trinta e seis a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação de mosto fermentado de fruta. A destilação deverá ser efetuada de forma que o destilado tenha o aroma e o sabor dos elementos naturais voláteis contidos no mosto fermentado, derivados dos processos de fermentação ou formados durante a destilação; e a bebida, em geral, deverá ser elaborada com a matéria-prima que corresponda ao nome do produto. O coeficiente de congêneres não poderá ser inferior a duzentos miligramas por cem mililitros e nem superior a seiscentos e cinquenta miligramas por cem mililitros em álcool anidro (BRASIL, 1997).

Aguardentes de fruta são bebidas destiladas compostas principalmente de água e etanol. Entretanto, poderá haver dezenas de outras substâncias, os quais são responsáveis pelas características sensoriais da bebida. Os álcoois superiores e os ésteres são os dois principais grupos de substâncias responsáveis pelo aroma deste tipo de bebida (GARCIALLOBODANIN *et al.*, 2008).

As bebidas alcoólicas obtidas pela fermentação, se comparado com um destilado carregam bem menor graduação alcoólica “As bebidas fermentadas, como a cerveja e o vinho, têm, no máximo, 18% de álcool, enquanto as destiladas podem atingir até 70%” (ASSIS e MOREIRA, 2013).

No estudo de Almeida *et al.* (2006), para a produção do fermentado de fruto do mandacaru, a polpa in natura apresentou uma concentração de sólidos solúveis totais de 11° Brix. No entanto, foi necessário adicionar sacarose ao mosto para que a bebida fermentada obtida apresentasse uma graduação alcoólica mais elevada.

2.2. Fontes de matérias – primas para produção de bebidas alcoólicas

Um dos principais aspectos de um processo biotecnológico é a fonte de matéria-prima ao qual faz parte de um tripé tecnológico. Por esta importância a fonte de matéria-prima deve ser abundante, de fácil acesso, de fácil transporte, de fácil armazenamento e de fácil comercialização. Entretanto nem sempre se consegue todas as características por uma determinada matéria-prima em um determinado processo.

Neste sentido observa-se que Kohatsu *et al.* (2009), encontraram em cascas de goiaba madura aproximadamente 6% de sólidos solúveis, que poderiam ser reaproveitados na fermentação alcoólica. Na laranja, foram encontrados teores de sólidos solúveis totais variando entre 10 a 15 % quando madura. Para o mamão, foram encontrados valores entre 9 e 12,5 % (FAGUNDES e YAMANISHI, 2001). Já para variedades de banana, teores variando de 18 a 25 % (SILVA *et al.*, 2004).

Avaliando o potencial de produção de etanol a partir do bagaço de maçã, Nogueira *et al.* (2005) produziram um fermentado com 33,93 g L⁻¹ de etanol sob temperatura ambiente (19 - 25°C) e empregando fermento (*S. cerevisiae*) seco, reidratado por 20 minutos, como inóculo. Este valor representa um rendimento de 44,53 %, partindo de uma concentração de 76,2 g L⁻¹ de açúcares fermentáveis. O suco de maçã, por ser mais rico em açúcares fermentáveis, resultou em 54,44 g L⁻¹ de etanol e um rendimento de 43,38% em etanol. Por meio da fermentação alcoólica de frutas e seus resíduos, pode-se obter, fermentados alcoólicos (vinhos) e aguardentes. São vários os estudos encontrados na literatura sobre a preparação e caracterização de fermentados de frutas, podendo ser citados o de cajá (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003), ata, ciriguela, mangaba (MUNIZ *et al.*, 2002), caju (TORRES NETO *et al.*, 2006) e laranja (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001). Também se podem citar alguns exemplos de aguardentes, como aguardente de manga (ALVARENGA; MAIA; OLIVEIRA, 2006), de mexerica (MUNHOZ *et al.*, 2006), de abacaxi (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006), de Pêra (GARCIALLOBODANIN *et al.*, , 2008) e de banana (SILVA *et al.*, 2009; ALVARENGA, 2011). Lara (2007) avaliou a adição de fontes de nitrogênio no mosto com objetivo de reduzir a formação de álcoois superiores durante a fermentação de banana. Alves *et al.* (2008) produziram aguardente de goiaba e Salviano *et al.* (2007) produziram e avaliaram sensorialmente aguardente de jaca.

Silva *et al.* (2004), ao produzirem aguardente a partir da casca, da polpa e da banana prata integral, concluíram que apenas aquelas obtidas da polpa e da banana integral apresentaram boa qualidade físico-química. Nogueira *et al.* (2005) estudaram a fermentação

do principal subproduto da agroindústria da maçã, o bagaço, por representar cerca de 20 a 40 % da quantidade total de maçã processada. O aproveitamento do bagaço de maçã do cultivar Fuji para a obtenção de extrato aquoso para a fermentação alcoólica foi avaliado e verificou-se que o mesmo constitui um ótimo meio para a produção de fermentado alcoólico.

Alvarenga *et al.* (2013) produziram aguardente de banana e manga e verificaram que a utilização dessas frutas na produção de aguardentes é alternativa viável diante do rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica. Porém, os autores recomendaram mais estudos para um melhor ajuste quanto aos teores de metanol e cobre para as aguardentes de manga e banana e de álcoois superiores para a aguardente de banana, uma vez que excederam os limites da legislação.

Também já foi avaliada, a utilização da casca e da borra, subprodutos da fabricação do fermentado de jabuticaba, para fabricação de aguardente de jabuticaba. O produto apresentou valores compatíveis aos da aguardente de frutas no que se refere à sua composição físico-química, com exceção do valor elevado de ésteres. Em um país que é mundialmente conhecido como produtor de aguardente de cana, o produto estudado é uma alternativa para produtores rurais que cultivam a jabuticaba, evitando perdas pós-colheita consideráveis durante a safra (ASQUIERI, 2009).

Cerqueira *et. al* (2008) determinaram a composição centesimal do bagaço da laranja e a quantidade de açúcares fermentáveis a fim de reaproveitá-lo para produzir etanol. O bagaço de laranja apresentou um baixo nível de carboidratos, o que explica a baixa produção de etanol, sugerindo que sejam realizados estudos posteriores sobre a hidrólise do bagaço.

2.3. Processos de fermentações para a produção de bebidas alcoólica

A fermentação define-se por ser um processo de reações químicas controladas enzimaticamente, onde acontece a degradação de moléculas orgânicas em compostos mais simples, de modo a liberar certa quantidade de energia (MENEGUZZO e RIZZON, 2006).

Fermentação alcoólica sob condições anaeróbicas, leveduras convertem açúcares em CO₂ e etanol, de acordo com a Equação 1, recuperando menos da energia armazenada nas moléculas de substrato: $C_6H_{12}O_6 + \text{levedura} \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2 + \text{ATP (Energia)} + \text{calor}$ (2). A conversão teórica de 180 g de açúcar em 92 g de etanol (51,1 %) e 88 g de dióxido de carbono (48,9 %) só poderia ser esperada na ausência de qualquer crescimento da levedura, de outros metabólitos e de perda de etanol por evaporação. Num modelo de fermentação, cerca de 95 % do açúcar é convertido em etanol e CO₂, 1 % em material celular

e 4 % em outros produtos, tais como o glicerol (PRETORIUS, 2000). O substrato utilizado na fermentação alcoólica é altamente variável e pode ser constituídos por produtos com açúcares, tais como a cana de açúcar, beterraba, mel, melaço e frutas, ou materiais amiláceos, como grãos de amido, raízes, tubérculos e outros. Os microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica são leveduras, tais como *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Kloe*.

A habilidade de converter açúcares em etanol é chamada de fermentação alcoólica e é característica de um pequeno grupo de micro-organismos, sendo, principalmente, das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* e a bactéria *Zymomonas mobilis* (CARDOSO, 2001).

A fermentação é uma das principais etapas na obtenção da aguardente de fruta. Durante a fermentação o açúcar e outros substratos presentes no mosto são transformados em etanol, CO₂ e uma infinidade de outros compostos pelas leveduras presentes. Estes compostos são responsáveis pelo sabor das bebidas alcoólicas.

O processo fermentativo se inicia assim que a levedura entra em contato com o mosto e é dividido em 03 fases: a fase preliminar (pré-fermentação), caracterizada pela adaptação das leveduras e pela multiplicação celular; a fase da fermentação principal e tumultuosa com desprendimento abundante de gás e produção de etanol e fase de fermentação complementar ou pós-fermentação, onde se observa a redução brusca da atividade fermentativa (CLETON e MUTTON, 2004).

As leveduras utilizadas na fermentação alcoólica para produção de bebidas devem apresentar características como alta tolerância ao etanol e bom rendimento, fermentar rapidamente o meio diminuindo assim o risco de contaminações; produzir melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis para a qualidade da bebida; apresentar estabilidade genética e no final da fermentação ser removida com facilidade do meio por floculação ou centrifugação (OLIVEIRA, 2001). Para Aquarone *et al.* (2001), a utilização de *S. cerevisiae* como agente de fermentação baseia-se na seguridade do micro-organismo, considerado GRAS (Generaly Reconised as Safe) e na técnica de fermentação amplamente conhecida e utilizada.

Existem diversos métodos de se conduzir uma fermentação: a forma descontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua. (SHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001)

O processo descontínuo ou batelada simples é o mais seguro quando se tem problemas de manutenção e de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator deve ser esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deverá ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do microrganismo desejado para o processo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do microrganismo. A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO e SATO, 2001a). O processo em batelada é muito utilizado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Os processos em batelada alimentada, também conhecidos como Melle-Boinot, têm se mostrado eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, por permitir a utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, pela possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, pelo controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo e pela capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO e SATO, 2001a). Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a adição do mesmo nos momentos mais propícios durante a fermentação (MCNEIL e HARVEY, 1990). A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO e SATO, 2001b). É possível trabalhar com altas concentrações de substrato, o que leva ao acréscimo da produtividade do etanol e à

diminuição da quantidade de vinhaça produzida e do volume necessário de reatores (IMPEVAN *et al.*, 1994; QUEINNEC e DAHHOU, 1994).

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua de caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001). Várias indústrias utilizam processos contínuos na produção de etanol, que bem operados levam a uma maior produtividade, porém com custos iniciais e de operação muito maiores, exigindo sistemas de controle mais sofisticados. Além disso, a fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do microrganismo em relação ao meio ambiente onde ele atua. Fatores como pH, temperatura, concentrações de sacarose, etanol e biomassa e viabilidade celular, dentre outros, influenciam na produtividade do sistema, exigindo maior controle sobre o processo (ATALA *et al.*, 2000). Nos processos de fermentação contínuos têm sido verificadas mutações nas células das leveduras, não só de comportamento fermentativo, como também relacionado às suas características genéticas (FINGUERUT, 2006).

2.4. Leveduras para uso em fermentação alcoólica

As leveduras têm distribuição mundial e metabolismo diversificado, especialidade fisiológica que proporciona a utilização de uma variedade de nutrientes em distintas condições ambientais (TORNAI-LEHOCZKI *et al.*, 2003). As leveduras são muito versáteis e muitas delas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais. Identificar leveduras de forma rápida e confiável pode ser importante na indústria, para estabelecer precisamente as causas de contaminação indesejada, e na medicina, para o diagnóstico de certas doenças. Uma identificação rápida em certos contextos também pode ser crucial, como por exemplo, quando uma determinada levedura está sendo utilizada industrialmente ou em experimentos de laboratório (BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990). Devido ao grande potencial microbiológico da Região Amazônica e a crescente aplicabilidade de enzimas na área biotecnológica, torna-se viável selecionar e identificar microrganismos produtores do complexo amilolítico.

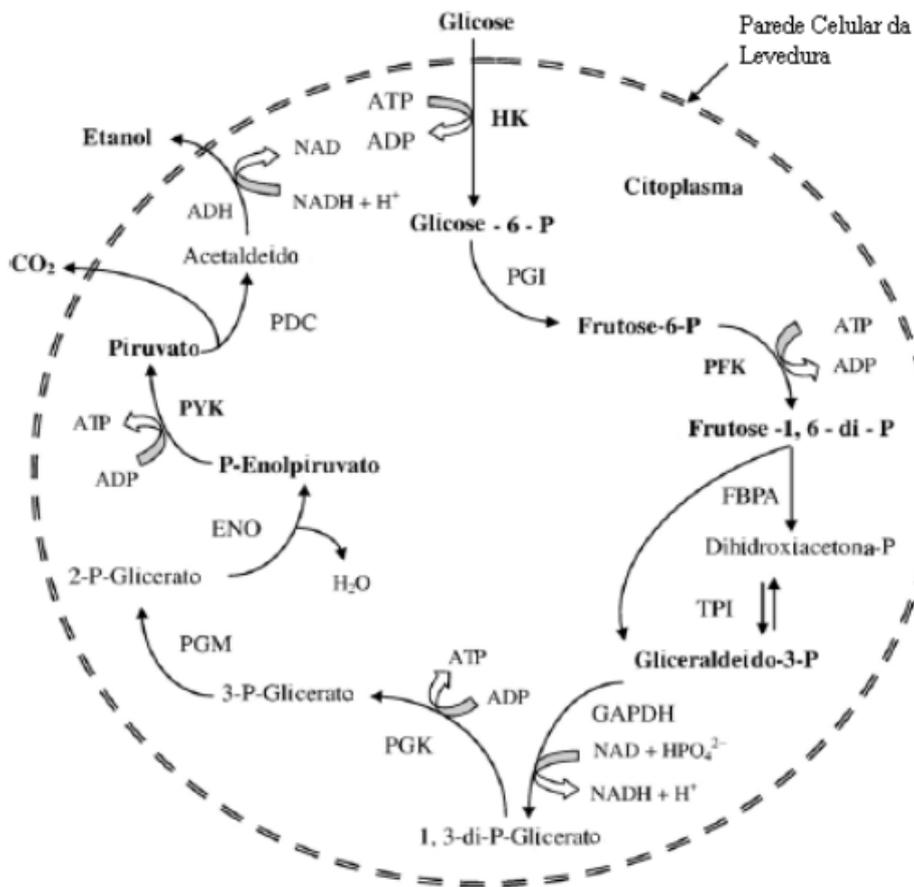
A fermentação alcoólica ocorre no interior de microrganismos capazes de converter açúcares assimiláveis (substrato oxidado) em etanol (substrato reduzido), através de uma série de reações bioquímicas, reguladas enzimaticamente. A oxidação parcial do substrato, gerando um composto orgânico reduzido, garante um mínimo de produção de energia para manutenção celular e o equilíbrio oxidativo. (CINELLI, 2012)

Historicamente, os microrganismos mais comumente utilizados na fermentação alcoólica têm sido as leveduras do gênero *Saccharomyces* e, dentre essas, *Saccharomyces cerevisiae* a principal espécie. Leveduras do gênero *Saccharomyces* também são consideradas como GRAS (generally recognized as safe), podendo ser usadas como aditivo em alimentos para consumo humano e, portanto, ideal para a produção de bebidas alcoólicas e fermento de pão. No entanto, outras leveduras possuem a capacidade de produzir etanol, bem como algumas espécies de bactérias, como, por exemplo, *Zymomonas mobilis* (CINELLI, 2012)

Entre os açúcares fermentescíveis pelas leveduras estão os monossacarídeos glicose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos maltose e sacarose e os trissacarídeos rafinose e maltotriose (dependendo da cepa). Polissacarídeos como amido e celulose não são metabolizados por leveduras (RUSSELL, 2003).

A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica (Embden-Meyerhof): uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula (Figura 4) (BAI *et al.*, 2008).

Figura 1: Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*. Abreviações: HK: enzima hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicomutase, ENO: enolase, Pyk: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, e ADH: álcool desidrogenase.



Fonte: BAI *et al.* (2008).

As leveduras são consideradas anaeróbios facultativos, ou seja, são capazes de crescer na presença ou na sua ausência de oxigênio. Quando o oxigênio é suficiente e a concentração de substrato é baixa, pouco ou nenhum etanol é produzido e a levedura segue a fosforilação oxidativa (respiração aeróbia), com o oxigênio como aceptor final de elétrons. Os açúcares são utilizados para produção de energia e crescimento celular. Entretanto, quando há a ausência de oxigênio (anaerobiose) ou alta concentração de glicose, o etanol é o principal produto.

2.5. Frutas e seus potenciais na geração de bebidas alcoólicas

Bebidas fermentadas de frutas constituem produtos promissores devida tendência de aceitação em pesquisas de consumo, além de contribuírem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis (SANDHU e JOSHI, 1995).

Entre as bebidas fermentadas produzidas a partir da polpa de frutas, o vinho de uva é a produzida em maior quantidade. No entanto, atualmente, diversas frutas vêm sendo utilizadas. Banana (AKUBOR *et al.*, 2003), cajá (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003), jabuticaba (CHIARELLI; NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005; DUARTE *et al.*, 2010a), cacau (DIAS *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2010a), laranja (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001), abacaxi (MUNIZ *et al.*, 2002), gabioba (DUARTE *et al.*, 2009), cagaita (OLIVEIRA *et al.*, 2011), papaia (LEE *et al.*, 2010a,2010b), kiwi (SOUFLEROS *et al.*, 2001) têm sido utilizadas com sucesso, resultando na produção de bebidas com boa aceitação sensorial.

Muitos países, principalmente os europeus, produzem vinhos de frutas pelos mesmos processos de fabricação, sendo a maçã, a pera, a groselha, a framboesa e a cereja as mais utilizadas. Nos países tropicais frutas como laranja, goiaba, abricó, abacaxi, manga (SANDHU e JOSHI, 1995) e caju (CASIMIRO *et al.*, 1989; ABREU, 1997) fornecem vinhos bastante apreciados e saborosos. A ata ou pinha, embora comercializada em vários estados brasileiros, apresenta uso muito restrito na agroindústria. É bastante aromática, de sabor agradável, açucarada e com baixa acidez, apresenta 48,13% de rendimento de polpa e teores médios de sólidos solúveis totais de 27,00 °Brix, 15,96% de açúcares redutores e pH em torno de 5,23 (ALVES *et al.*, 1999; MOURA *et al.*, 2000a).

A cirigüela, por sua atrativa coloração e excelente sabor, vem sendo comercializada na forma “in natura” em diversas regiões do Brasil. A fruta madura apresenta 6,70% de açúcares redutores, 1% de amido, 70,22% de rendimento médio de polpa, 21,25 °Brix, 0,62% de acidez titulável (ácido cítrico), com índice de maturação (SST/ATT) de 34,32 e pH 3,44 (FILGUEIRAS *et al.*,1999; FILGUEIRAS *et al.*, 2000).

A mangaba, muito apreciada na região Nordeste, apresenta ótimo aroma e sabor. É utilizada na produção de doces, xaropes, compotas, vinhos, vinagres, sucos e sorvetes. Apresenta 1,77% de acidez titulável, 16,72 °Brix, 12,98% de açúcares totais, pH 2,9 e rendimento de polpa de 87% (MOURA *et al.*, 2000b, MOURA *et al.*, 2001).

A utilização de frutas na produção de bebidas surge como uma alternativa para o emprego do excesso de produção, no caso de frutas comercialmente cultivadas, como uma nova forma de exploração de frutas nativas não comercialmente cultivadas, podendo gerar recursos econômicos, principalmente nas regiões de ocorrência das frutas. (DUARTE *et al.*, 2009).

2.6. Manga como fonte de matéria-prima para geração de aguardente

A mangueira (*Mangifera indica L.*) é uma frutífera originária da Índia pertencente à família botânica *Anacardiaceae* que foi introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVI. A mangicultura se estabeleceu de forma expressiva na região Nordeste e Sudeste do país devido às condições climáticas dessas regiões. Essa frutífera pode ser propagada por sementes ou enxertia e apresenta longo período juvenil com distinção entre variedades. A primeira frutificação dá-se três anos após o plantio. A época de colheita obedece ao estado de maturação e a finalidade dos frutos, como por exemplo, para a exportação, os frutos devem ser colhidos antes de completarem a maturação (CARVALHO, *et al.*, 2004)

Na literatura são encontrados alguns trabalhos sobre aguardentes de frutas. A produção de aguardente de manga foi estudada por Simão (2005) e por Alvarenga (2006). Em ambos os trabalhos alguns compostos como os álcoois superiores apareceram em excesso no destilado obtido. Além dos álcoois superiores, Alvarenga (2006) também encontrou elevado teor de cobre na bebida obtida.

O Brasil é um dos países com grande produção mundial de frutas. Entretanto, há um grande desperdício pós-colheita para algumas culturas, o que, notadamente, gera uma grande quantidade de resíduos agroindustriais. Neste mesmo sentido, existem frutas que apresentam baixo potencial de mercado, mas que apresentam produção elevada. Deste modo, existe a necessidade de se desenvolver novos processos que permitam a redução das perdas favorecendo a geração de novos produtos com potencial econômico aceitável. Uma das alternativas para que isso ocorra é a produção de bebida alcoólica a partir de frutas nativas ou ocorrentes de baixo potencial de mercado ou dos resíduos agroindustriais.

As regiões Norte e Nordeste do Brasil apresentam grande diversidade de frutos tropicais, com boas perspectivas para exploração econômica que, até o momento são pouco utilizadas. A manga (*Mangifera indica L.*) é amplamente comercializada, regionalmente, na forma de polpa, mas carece de informações técnicas científicas que viabilizem seu aproveitamento agroindustrial. (MUNIZ *et al.*, 2002). Entretanto, algumas espécies apresentam pouco potencial tecnológico e de comercialização e, portanto, não apresentam valor de mercado aceitável para sua comercialização. Por este motivo, este tipo de fonte de matéria-prima apresenta as características adequadas para fazer parte do processo de produção de aguardente, descritas neste projeto.

Várias frutas podem ser utilizadas para a formulação de mostos que podem posteriormente ser submetidos à fermentação alcoólica por ação de leveduras. Entretanto, não

há tecnologia totalmente voltada para a elaboração destas bebidas no que diz respeito à levedura ser utilizada, a temperatura adequada de fermentação, o tipo de tratamento que o mosto da fruta, ou a própria fruta, deve ser submetido nas fases de fermentação (DIAS *et al.*, 2003).

Com base no que está descrito acima, se estudará a manga comum como fonte de matéria-prima para verificar a viabilidade de geração de um processo de fermentação, visando a produção de aguardente.

2.7. Perspectivas biotecnológicas e econômicas de aguardente de manga

Apesar da tradição e importância econômica desta bebida, a cadeia produtiva da aguardente no país não é tecnologicamente homogênea, havendo uma busca no desenvolvimento de tecnologias para aperfeiçoar e controlar a qualidade e a padronização da bebida. O aprimoramento da qualidade e da padronização da aguardente e da cachaça é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais e seja aceita pelo mercado externo, proporcionando condições de abertura e manutenção do mercado de exportação. Além disso, proporcionaria aceitação no mercado interno pelas classes de maior poder aquisitivo, as quais exigem bebida de boa qualidade (MIRANDA *et al.*, 2007)

A busca por novas descobertas e o aprimoramento de novos processos para a geração de novos produtos tem sido realizada de forma que possam garantir uma melhor qualidade das aguardentes com um menor custo, principalmente no que se refere ao aproveitamento de matérias-primas não convencionais e abundantes com potencial de uso e com características fermentescíveis, visando aproveitar o potencial de cada região. A manga, a uva e o maracujá, são exemplos que fazem parte do grupo de frutas nas quais as principais características incluem a coloração intensa, sabor agradável e aroma intenso, constituído principalmente por ésteres, aldeídos, álcoois e cetonas (NARAIN *et al.*, 2004). São frutas bastante conhecidas nos países da América do sul, onde há uma produção significativa. Por isso, um dos objetivos deste estudo foi aproveitar os atrativos desses frutos e elaborar bebidas fermento-destiladas que consigam manter as suas características de aroma, através.

CAPÍTULO 1

Aspectos Ambientais, Econômicos e Biotecnológicos da Polpa do Fruto de *Mangifera indica* L.

Rubens Menezes Gobira
 Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
 Alberdan Silva Santos

PUBLICADO COMO CAPITULO DE LIVRO:

Gobira, Rubens Menezes; Gobira, Patrícia Suelene Silva Costa; Santos, Alberdan Silva. ASPECTOS AMBIENTAIS, ECONÔMICOS E BIOTECNOLÓGICOS DA POLPA DO FRUTO DE *Mangifera indica* L. “Bioculturalidade, Conservação e Biotecnologia na Amazônia Oriental”. Cap. 19 p.349-364; Editora CRV; Curitiba-PR, 2018

ISBN da coleção 978-85-444-2574-9
 ISBN deste volume 978-85-444-2575-6

1. Aspectos Botânicos

Mangifera indica L., frutífera de origem asiática e amplamente cultivada nas regiões tropicais pertencente à família Anacardiaceae que abriga cerca de vinte e quatro gêneros, em geral, formada de árvores ou arbustos (SINGH, 1960). Essa espécie pode ser propagada por sementes ou enxertia e apresenta longo período juvenil com distinção entre variedades. A primeira frutificação dá-se três anos após o plantio. A época de colheita obedece ao estado de maturação e a finalidade dos frutos, como por exemplo, para a exportação, os frutos devem ser colhidos antes de completarem a maturação (CARVALHO *et al.*, 2004).

A mangueira é uma árvore frondosa e perenifólia, que pode atingir até 30 m de altura. Possui copa globosa e grande (Figura 1 A), larga e abobadada nas arvores não podadas; tronco baixo, ramificado desde os dois ou três metros de altura. Folhas simples aromáticas, coriáceas, lanceoladas, com tamanhos que variam de 8 a 40 cm de comprimento, quando jovens, róseo-vermelhadas, depois gradativamente passando ao verde.

Figura 1: A - Árvore de *M. indica* B – Flores, C - Frutos da Manga.



Fonte: A e B: AUTOR, 2017; C: COIMBRA, 2017.

Inflorescência em panículas terminais multirramosas. Flores pequenas (Figura 1 B), polígamas (hermafroditas e unissexuadas na mesma planta), cálice de 4 a 5 sépalas, 5 pétalas, imbricada, brancacentas, com minúsculas estrias purpúreas e com um disco anular, carnoso, 5 lobado; flores de ambos os tipos com apenas um estame desenvolvido e fértil e, às vezes, 3 ou 4 minúsculos estaminódios; ovário globoso com um estilete subterminal ou lateral. De acordo com Silva Júnior; Costa e Lima (2010), a inflorescência é em panícula com flores que variam de cor branca a amarelas. É uma espécie que apresenta floração de novembro a junho e frutificação de janeiro a julho. A polinização pode ser realizada por abelhas, formigas, moscas e pequenos insetos. A dispersão pode ser realizada por gravidade e animais.

O fruto (Figura 1 C) é uma drupa carnosa, subglobosa, sub-reniforme ou subcordiforme, de tamanho, cor e peso variáveis de menos de 100 g a mais de 1 kg (LORENZI *et al.* 2006); polpa amarelo – alaranjado macia ou fibrosa; endocarpo (caroço) comprimido lateralmente, lenhoso-fibroso, sulcado longitudinalmente; semente formada por dois volumosos cotilédones plano convexos.

2. Aspectos Históricos, Origem e Disseminação

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma planta que foi domesticada há milhares de anos, e caracteriza-se por produzir frutos de ótima qualidade, sendo considerada uma das mais importantes espécies frutíferas de clima tropical. Não obstante tenha se originado em locais de clima quente, ela se adapta bem às condições de clima subtropical. Principalmente devido à sua boa plasticidade fenotípica, a qual confere ampla facilidade de adaptação aos diferentes ambientes, a manga se dispersou por todos os continentes, sendo cultivada atualmente em todos os países de clima tropical e subtropical. (FERREIRA *et al.* 2002)

É uma espécie frutífera originária da Índia, e que apresenta duas variedades geográficas: uma da Índia e outra das Filipinas e Sudoeste da Ásia (SILVA, 2000). Da Ásia, a manga se dispersou por vários países, apesar de haver uma grande limitação com relação à longevidade das sementes (altamente recalcitrantes), aliada ao tempo de duração das viagens, na época em que ocorreu a dispersão da espécie. Mukherjee (1985) relata que a distribuição da mangueira se concentra entre os trópicos de Cancer e Capricórnio, nas latitudes de 20° Norte a 20° Sul, atingindo atualmente quase 100 países.

A mangueira foi introduzida no Brasil, pelos portugueses, no século XVI, mais especificamente na Bahia (GOMES, 1972), caracterizando-o como o primeiro país da

América a cultivar a mangueira; logo em seguida foi introduzida no México pelos espanhóis. As primeiras introduções no Brasil, no entanto, referiam-se as variedades da raça filipínica, que geralmente produzem frutos com polpa fibrosa e de baixa qualidade e com semente poliembriônica, com pequena variação genética. Isso fez com que a cultura da manga ficasse limitada a pequenos pomares, sem muita expressão, e especificamente para atender ao mercado interno de maneira bem regionalizada, por quase três séculos. Na metade do século XX, no entanto, foram realizadas introduções de variedades melhoradas da raça indiana, procedentes da Florida/USA, portadoras de melhor qualidade, com sementes monoembriônicas, que induzem grande variabilidade quando plantadas de pé franco. Este fato modificou sensivelmente a indústria mangícola nacional, dando uma nova perspectiva à cultura, pois essas variedades americanas, que produzem frutos com pouca fibra, bem coloridos e mais resistentes à antracnose, são mais comercializáveis, permitindo inicialmente ampliar o excelente mercado interno, e mais recentemente permitindo conquistar o mercado externo, notadamente dos Estados Unidos e Japão (FERREIRA *et al.* 2002). A cultivar *Haden* foi introduzida no Brasil em 1931, mas só a partir da década de 60 foi plantada comercialmente, e apresenta uma série de limitações, principalmente com relação a sua suscetibilidade à *seca* da mangueira e à alternância de produção. Em 1970 foi introduzida a variedade *Tommy Atkins*, junto com muitas outras variedades, que foram testadas e algumas recomendadas para as condições brasileiras. Com o aumento da demanda interna e o interesse crescente pelas exportações a partir de 1980, a *Tommy Atkins* se mostrou bastante adequada, principalmente devido a sua maior tolerância à antracnose, e por estes aspectos, juntamente, com a variedade *Keitt*, estas têm sido as variedades mais plantadas no país (DONADIO, 1996).

3. Aspectos Ornamentais

Ao longo da história, o melhor exemplo de cidade tropical que investiu na arborização urbana foi a capital paraense, Belém, pois foi uma das primeiras cidades brasileiras a arborizar os logradouros públicos e protagonizar um período de farta arborização nas ruas da cidade, chegando a receber o título de “cidade das mangueiras” (PORTO *et al.*, 2013). Segundo o mesmo autor, as árvores presentes nas vias públicas de Belém são de fundamental importância, pois garante o sombreamento, manutenção do ciclo da água, sustentação do solo e melhoria do conforto urbano. Além disso, servem como elemento de contemplação, além de

serem fornecedoras de flores e frutos atrativos, e servirem de referência social, possibilitando a convivência do homem com a natureza no espaço construído.

A mangueira foi à espécie que mais se destacou por diversas singularidades de adaptação ao ecossistema da região: ser uma árvore clássica dos antepassados, ter rápido crescimento, folhagem densa e beneficiar com uma ampla sombra (ANDRADE, 2003). Segundo o mesmo autor, esta espécie escolhida atendeu perfeitamente a problemática ambiental da cidade da época de seu plantio, ao criar um microclima agradável, paisagem contemplativa e verdejante, bem-estar significativo e formação de túneis verdes nas ruas e avenidas da cidade de Belém (Figura 2 A).

De acordo com Nascimento *et al.* (2010), a cidade das mangueiras acabou se transformando em destaque nacional devido os túneis formados pelas mangueiras (Figura 2B) que podem ser encontradas nos bairros mais centrais da cidade. Além disso, a paisagem tem uma forte influência da característica local, com comunicação com o rio Guajará, oferecendo um destaque paisagístico.

A mangueira foi amplamente disseminada na cidade de Belém no final do Século XIX e princípio do Século XX, razão pela qual se tornou conhecida como "cidade das mangueiras" e a cultura local apelidaram o seu estádio de futebol de "Mangueirão". Hoje se discute muito sobre a conveniência do seu plantio, uma vez que está na maioria das ruas ornadas com mangueiras. O Asfalto e o calçamento de cimento causam problemas no sistema radicular das árvores, e aliados a poda inadequada (Figura 2 C), faz com que estas reduzam o potencial de produtividade. Outro ponto é a retirada precoce dos frutos por vendedores ambulantes, donos de veículos que não possuem garagens e taxistas que pagam para que tirem as mangas ainda em amadurecimento para que reduza os riscos de prejuízos financeiros em seus veículos "evitando amassados e vidros quebrados" causados pelos frutos (O LIBERAL, 2017).

A população, entretanto, não aceita que nas áreas onde um exemplar tem que ser substituído não seja muda de mangueira o vegetal substituto, e também na cidade do Rio de Janeiro pode-se observar a presença histórica desta árvore, pois ela deu o nome a uma das suas maiores favelas/bairros, e depois a uma das grandes escolas de samba do Brasil, a "Estação Primeira da Mangueira".

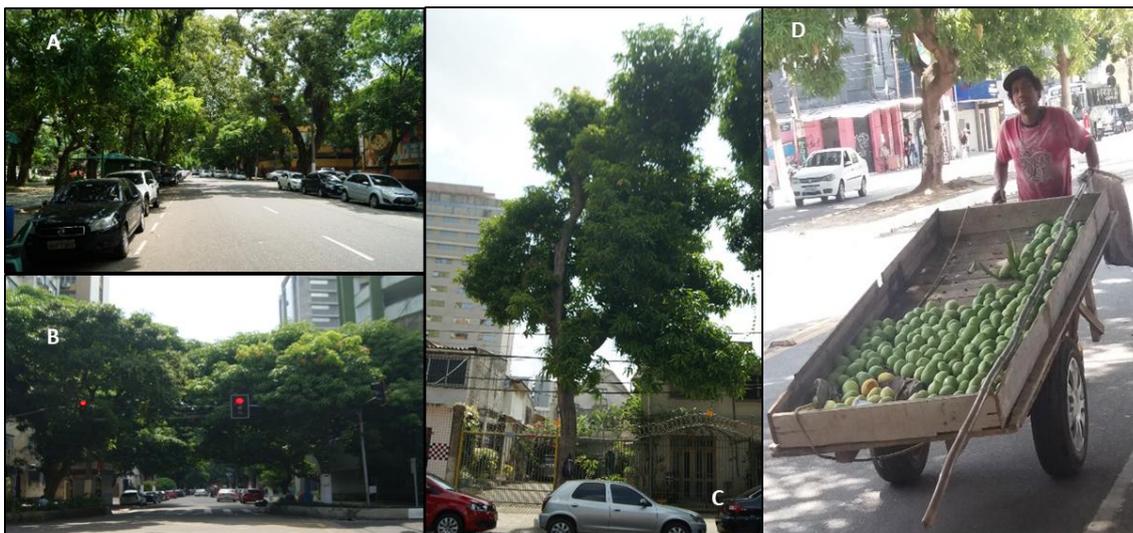
O quadro 1, descreve as variedades mais conhecidas encontradas nas Feiras de Belém – PA, no fim da estação seca e início da chuvosa, incluindo algumas, raras e de nomes contraditórios.

Quadro 1. Descrição das variedades de manga

VARIETADES	CARACTERÍSTICAS
Comum	Predomina na arborização da cidade e fornece a maioria dos frutos, não qualificados, encontrados nas férias.
Bacuri	Manga de casca amarela, polpa abundante e macia, pouco fibrosa, bem cotada no comércio; o fruto pesa, em média 300g e a semente 30 a 50g.
Rosa	Fruto grande, subcordiforme, casca em parte amarelada, em parte rósea forte, muito vistosa, polpa macia de sabor e cheiro característicos. Os frutos, em grande parte procedente no Marajó, pesam entre 450 a 550g e caroço entre 35 a 50g
Chana, Caiana, Moça e Falsa Cameté	Fruto pequeno, alongado e sinuoso com uma depressão em forma de sulco na região ventral superior, casca amarelada esverdeada, polpa escassa e fibrosa, porém de sabor agradável. Frutos variam entre 100 a 150g e caroço ente 25 a 30g.
Espada	Fruto de casca amarela e verde esmaecido, polpa com aroma agradável. Frutos variam entre 300 a 500g, caroço entre 30 a 50g
Cameta – (Verdadeira)	Casca esverdeada, polpa escassa, porém saborosa. Às vezes confunde – se com a “Chana” mas distingue-se pela forma menos alongado e a depressão ventral ausente ou pouco pronunciada.
De cheiro	Ocasionalmente encontrada na arborização da cidade. Frutos Menores que os demais, de sabor medíocre. A casca torna-se, às vezes, de coloração rósea escura no lado exposto ao sol. Frutos variam de 90 a 150g e o caroço de 15 a 20g.

Dessa forma, a mangueira conquistou seu espaço no cenário urbano de Belém, sendo legalmente instituída como patrimônio histórico, conforme a lei nº 8909, de 29 de março de 2012, que dispõe sobre o plano municipal de arborização urbana de Belém. (SILVA *et. al.*, 2015).

Figura 2: A - Contribuição das mangueiras para regulação do microclima, melhoria da qualidade do ar, fornecimento de sombra e bem-estar físico. B - Túneis de mangueira (*Mangifera indica* L.) no centro da cidade de Belém – PA. C - Poda inadequada de mangueiras no centro da cidade de Belém – PA. D - Comercialização dos Frutos da Manga por ambulante.



Fonte: O AUTOR, 2017

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é importante atrativo para fauna por causa do seu fruto. Contudo, ressalta a problemática do sistema radicular não responder bem ao solo urbano compactado, e as construções, que por vezes são levantadas pelas raízes. (LIMA NETO; MELO e SOUZA, 2011).

4. Aspectos Alimentício, Econômicos e Ambientais

O Brasil, por possuir uma riquíssima diversidade biológica, pode se constituir em uma fábrica natural de alimentos e/ou medicamentos de fácil acesso, que podem servir aos usos mais comuns do cotidiano urbano e rural a partir dos quintais. Os quintais caseiros são reservatórios de agrobiodiversidade em comunidades de todo o Mundo, sendo um elemento proeminente na paisagem rural e/ou urbana podendo ser encontrado na maioria dos lares de diferentes comunidades (OAKLEY, 2004). Os quintais caseiros na Amazônia são de grande importância e quase sempre expressam um “contínuo rural-urbano” (WINKLERPRINS, 2002). Estes podem ser de diferentes utilidades e de enorme riqueza em se tratando de recursos naturais. Um dos objetivos de um pomar doméstico é o de fornecer frutas de qualidade nutritiva, e livres de produtos químicos para o consumo familiar durante todo o ano, melhorando a qualidade da alimentação e diminuindo as causas de doenças por desequilíbrios alimentares e contribuindo para a renda familiar. Foi observado que, em Boa Vista - Roraima,

nos bairros de renda baixa os maiores IVP (índice de valor de preferência) pertenceram a *Mangifera indica* L. (ROCHA e BARBOSA, 2008).

O fruto da mangueira se destaca no meio urbano da cidade de Belém, capital paraense, pois, uma parte da população paraense faz da manga uma fonte temporária de renda nas épocas de safra, que geralmente se prolonga entre os meses de dezembro e março, coincidindo com o período chuvoso (LOUREIRO e BARBOSA, 2010).

Não só na capital, mas também em todo o interior do estado cultiva-se a mangueira, não somente para sombreamento, mas também pelos frutos, importante parcela na alimentação das classes populares com pratos variados na culinária. Segundo moradores mais antigos da região é hábito o consumo da manga de forma “in natura” ou em mistura com farinha (alimento indispensável à mesa dos nativos daquela região).

A seguir exemplos de pratos na culinária utilizando como matéria-prima a manga: Creme de manga, Mousse de manga, Compota de manga, Licor de manga, Iogurte de manga, Sorvete de manga, Picolé de manga, Bolo de manga, Pudim de manga, Salada de manga.

O maior aproveitamento do fruto tem sido na forma "in natura" com sua comercialização por ambulantes (Figura 2 D), feiras livres e supermercados ou processados na forma de suco, compotas, geleias, doces, sorvete, entre outras. Em adição, as folhas bem como o tronco (madeira) podem ser aproveitadas nas indústrias farmacêuticas e madeireira, consecutivamente.

Pesquisas científicas mostraram que a composição centesimal das cascas da manga revelou a sua importância nutricional e a possibilidade da utilização dessa parte, até então considerada não comestível, na dieta brasileira, visando a contribuir para a melhora do estado nutricional da população e a reduzir os problemas causados pela desnutrição no Brasil, além de reduzir o acúmulo de lixo orgânico produzidos no País. A Tabela 1 apresenta os resultados médios das determinações dos constituintes da composição centesimal das cascas e de polpa de manga, revelando que esse resíduo pode ser considerado uma importante fonte de substâncias orgânicas, como proteínas, carboidratos e fibras, além de elementos minerais. (MARQUES *et. al.*, 2010)

Tabela 1- Composição centesimal da casca e da polpa de manga (g/100g).

Componentes	Casca da manga *	Polpa da manga*
Umidade	78,70 + 0,45	82,11 + 0,21
Resíduo Mineral Fixo	0,99 + 0,05	0,34 + 0,06
Lipídeos	0,18 + 0,01	0,61 + 0,03
Proteínas	1,24 + 0,11	0,44 + 0,08
Açúcares Redutores	0,55 + 0,02	4,13 + 0,12
Açúcares não redutores	1,69 + 0,04	8,94 + 0,17
Amido	0,19 + 0,13	0,15 + 0,16
Fibra Alimentar Total (FAT)	11,02 + 0,07	3,28 + 0,28
Carboidratos totais	12,89	16,5

* Média + Desvio-Padrão

Fonte: MARQUES *et al.*,2010

A casca da manga também foi inserida na culinária sendo utilizada para pratos como: Mousse, bolo, pudim, sucos, sorvete e doce.

Outro possível nicho de mercado para a manga são as frutas cristalizadas que devem ser translúcidas, túrgidas, com consistência uniforme, isentas de granulosidades, com superfície seca e não áspera, cor e sabor agradáveis. Na Ásia, a manga é geralmente preservada na forma desidratada, porém este fruto seco normalmente apresenta textura indesejável, cor pouco intensa, sabor alterado, além da perda do valor nutricional, o que reduz sua importância econômica (TEDJO *et al.*, 2002).

O consumo da manga no Brasil se dá na forma in natura. A falta de pessoal treinado e de infra-estrutura para sua comercialização e conservação, tem gerado uma perda em torno de 30% da produção e, em alguns casos, podendo atingir 50% (PINA, MAIA, SOUZA FILHO, 2003). A composição química (Tabela 2) da manga varia com as condições de cultura, variedade, estágio de maturação (Tabela 3), mas em geral, a fruta in natura tem um alto teor de sólidos solúveis totais, pobre em fontes de minerais e o conteúdo de açúcares é alto se comparado a muitas frutas (SANTOS, 2003).

Tabela 2: Caracterização físico química

	pH	ATT	SST	ART	Fonte
Polpa madura variedade Tommy	4,28	0,46	11	4,06	Maciel, 2009
Polpa madura variedade Bacuri	3,49	0,31	13	6,58	Gobira <i>et al.</i> , 2017

pH: potencial hidrogeniônico; ATT: acidez total titulável (ácido cítrico.100g⁻¹); SST: Sólido solúveis totais; ART: Açúcares redutores totais (Brix).

Tabela 3: Estádios de maturação definidos em função das características da casca e da polpa da manga “Tommy”

Estádio de maturação	Caracterização da casca e da polpa da manga
Verde	Casca verde; polpa de cor verde amarela pálida e consistência firme.
De vez	Casca amarela; polpa de cor amarela e consistência levemente macia.
Maduro	Casca de cor amarela escura; com pontos escuros ou avermelhados, podendo apresentar sinais de enrugamento; polpa muito macia.

Fonte: MACIEL, 2009

O conhecimento popular sobre plantas medicinais, embora rico de informações, é frequentemente mal aproveitado, carece de compilação e interpretação, pois é disperso e confuso. O resgate destas informações permite o estudo adequado e a inserção das espécies de interesse farmacológico nos sistemas agroindustriais.

A manga é bastante usada na medicina doméstica.

1. Combate as bronquites mais rebeldes, tem propriedades antiescorbúticas
2. É depurativa do sangue e favorece a diurese.
3. Como expectorante, a manga é indicada contra as enfermidades das vias respiratórias, como catarros, tosse, bronquite, etc. Nestes casos, usa-se preferivelmente em forma de xarope, com mel de abelhas.
4. A resina que se forma sobre os galhos também exerce ação depurativa.

5. O suco que sai dos ramos é usado com antidiarréico.
6. As folhas novas são tidas como antiasmáticas. Em decocção, dão um excelente peitoral, que se usa contra a bronquite. Bebe-se com mel de abelhas.
7. Para curar a inflamação das gengivas, enxagua-se a boca com o decoto das folhas.
8. Com os brotos dos ramos se prepara um bom vermífugo.
9. Usa-se exteriormente o decoto das folhas, em fomentações ou fricções, contra qualquer tipo de contusão.
10. A amêndoa do caroço contém propriedades vermífugas.
11. A casca do tronco é usada, em decocção, contra as afecções febris. Tomam-se duas xícaras por dia.

Algumas precauções devem ser tomadas para evitar efeitos colaterais pois, o látex que exsuda da fruta, tronco, ramos e casca do fruto verde contém mangiferina, ácido resino, ácido mangífero, resinol e mangiferol. Esse látex é irritante da pele de ação retardada. Pode causar coceira ao redor dos olhos, edema da face e dificuldade respiratória.

A casca de manga revelou ser uma importante fonte de elementos minerais (Tabela 4), que exercem funções essenciais no organismo, como íons dissolvidos em fluidos corpóreos, que regulam as atividades de muitas enzimas, mantêm o equilíbrio ácido-base e a pressão osmótica (ANDRADE, 2003). Os resultados das determinações realizadas nessas cascas mostraram que as concentrações desses elementos foram superiores às encontradas na polpa, exceto para zinco e ferro.

Tabela 4 - Teor de minerais da casca e da polpa de manga Tommy (mg/100g).

Componentes	Magnésio	Fósforo	Ferro	Sódio	Potássio	Zinco	Cálcio
Casca*	22,38	17,53	Tr	37,47	176,05	Tr	74,06
Polpa*	7	14	0,1	Tr	138	0,1	8

* Média aritmética

Tr – Traços

A manga (*Mangifera indica* L.) faz parte do elenco das frutas tropicais de importância econômica, não só pela aparência exótica, mas também por ser uma rica fonte de compostos bioativos (BRANDÃO *et al.*, 2003). Estes compostos presentes nos frutos são de interesse para a saúde devido à sua ação antioxidante, com efeito protetor contra alguns tipos de câncer, doenças do sistema cardiovascular e do envelhecimento (MACIEL, 2009).

São exemplos de Princípios Ativos presentes na manga: **Óleo resina:** terebentina; **Fruto:** Celulose; **Glicosídeo:** mangiferina; **Fibras;** **Sais minerais:** cálcio, fósforo, ferro; Proteínas; Açúcares; Pigmentos; Vitaminas: A, B1, B2 e C; **Flores:** tanino; **Óleo essencial:** álcool sesquiterpênico, mangiferol enmangi-ferona (cetona); **Principais componentes:** 2-octano, alanina, alfa-felandreno, a-pineno, ácido ambólico, ácido ambônico, arginina, ácido ascórbico, fl-caroteno, fl-pineno, carotenóides, furturol, gaba, ácido gálico, ácido galotânico, geraniol, histidina, isoleucina, ácido isomangiferólico, caempferol, Imoneno, ácido linoleico, ácido mangífero, mangiferina, mangiferol, ácido mangiferólico, ácido mirístico, neo-fl-caroteno b, neo-B-caroteno u, neoxantofil, nerol, neril-acetato, ácido oleico, ácido p-cumarínico, ácido pantotênico, peroxidase, fenilalanina, fitina, prolina, quercetina, xantofil.

5. Aspectos Biotecnológicos e Fonte de Produtos

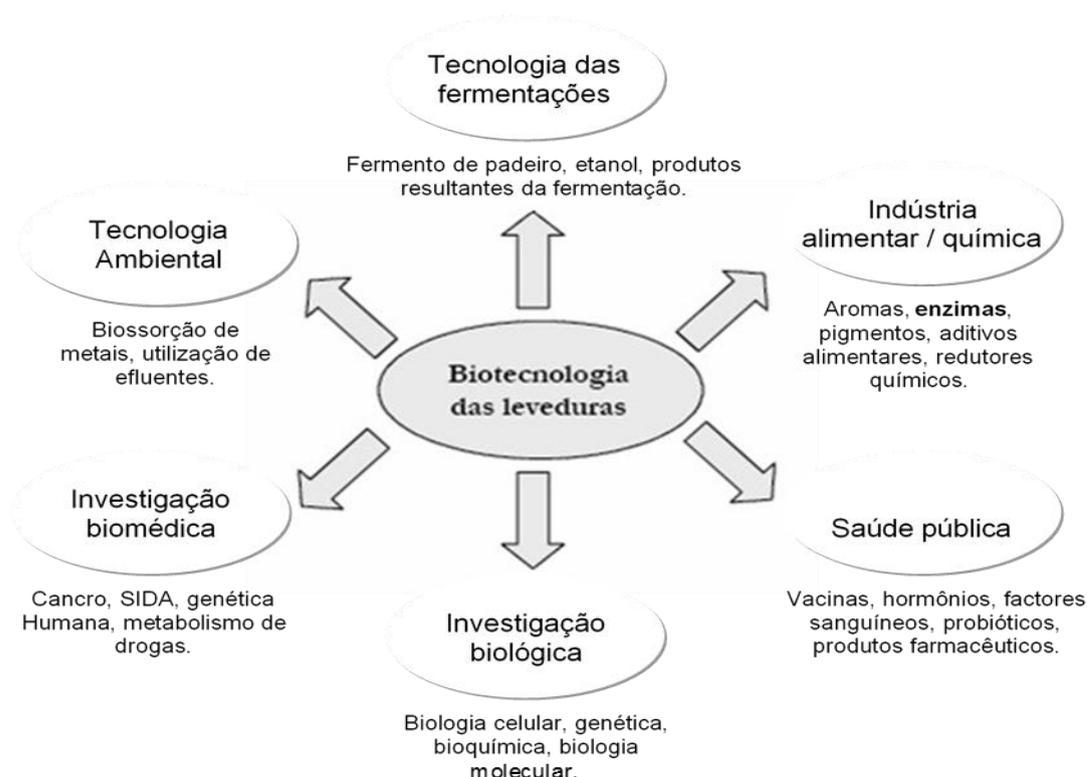
A manga tem a respiração celular de forma intensa e com isso, sua deterioração é mais rápida, o que dificulta a comercialização de toda a safra da fruta in natura, sendo a industrialização uma alternativa para o excedente de produção, além de possibilitar o consumo da fruta na entressafra (SUGAI, 2002).

A busca por novas descobertas e o aprimoramento de novos processos para a geração de novos produtos tem sido realizada de forma que possam garantir uma melhor qualidade das aguardentes com um menor custo, principalmente no que se refere ao aproveitamento de matérias-primas não convencionais e abundantes com potencial de uso e com características fermentescíveis, visando aproveitar o potencial de cada região. A manga, a uva e o maracujá, são exemplos que fazem parte do grupo de frutas nas quais as principais características incluem a coloração intensa, sabor agradável e aroma intenso, constituído principalmente por ésteres, aldeídos, álcoois e cetonas (NARAIN *et al.*, 2004). São frutas bastante conhecidas nos países da América do Sul, onde há uma produção significativa.

A utilização de frutas na produção de bebidas surge como uma alternativa para o emprego do excesso de produção, no caso de frutas comercialmente cultivadas, como uma nova forma de exploração de frutas nativas não comercialmente cultivadas, podendo gerar recursos econômicos, principalmente nas regiões de ocorrência das fruteiras. Além disso, representa uma alternativa de exploração de ecossistemas ameaçados, como o cerrado brasileiro (DUARTE *et al.*, 2009).

Hawksworth (2001) estima a existência de 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta, e menciona que apenas 5% da diversidade são conhecidas. Atualmente, há um grande interesse industrial e biotecnológico e, na verdade, um sentido de urgência sobre a documentação da biodiversidade das leveduras no Brasil, onde, invariavelmente, uma porcentagem das espécies encontradas é ainda desconhecida para a ciência (ROSA *et al.*, 2007). A Figura 3 descreve, de um modo geral, a aplicação biotecnológica das leveduras em diversas áreas científicas.

Figura 3: Diversidade de áreas que envolvem a biotecnologia das leveduras.



Fonte: Pinheiro, 2004.

Sem as leveduras não existiriam bebidas fermentadas como cervejas e vinhos, e outros alimentos nos quais esses microrganismos têm papel de destaque em sua produção, como também na produção de pão e queijo. Deve-se mencionar ainda que as leveduras são responsáveis pela produção de enzimas de interesse industrial e de valor econômico. (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004)

Estudos preliminares na manga foram capazes de isolar e identificar leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Espécie de levedura capaz de transformar rapidamente

açúcares em etanol e dióxido de carbono, sob condições tanto anaeróbias (ausência de oxigênio) e quanto aeróbias (presença de oxigênio).

6. Perspectivas

A obtenção de álcool de fontes renováveis tem sido alvo na obtenção de bebidas alcoólicas e produtos derivados, em função da preservação ambiental e envolvimento da agricultura familiar, assim como aumento da qualidade dos produtos e melhoria do valor de mercado, constituindo assim um importante setor da indústria alcooleira. Este nicho de mercado se apresenta como uma alternativa quando a fonte de matéria prima passa a ser resíduo ou produtos agroindústrias que não apresentam potencial de mercado, mas que podem ser transformados para a geração de produtos nobres. Neste seguimento, a inovação envolvendo tecnologia de transformação e o envolvimento de perspectivas de geração de processo, produto e a minimização do impacto ambiental, associado a geração de renda

Dentro deste aspecto, a investigação de técnicas de fermentações aplicadas a uma matéria prima de fácil acesso e que possibilite um processo economicamente viável têm sido foco de pesquisas científicas utilizando a manga (*Mangifera indica*), em função de possuir grande abundância na região Amazônica e sua demanda sazonal é aproveitada para alimentação, constituindo assim uma fonte de matéria-prima para uso como fonte de biotransformações de seus açúcares em álcool, usando-se leveduras naturalmente ocorrentes como sistema adaptados especificamente para produção de aguardente. Em geral, manga apresenta polpa rica em açúcares fermentescível e um potencial aromático que permitirá realizar um processo para geração e aguardente com aromas que poderá se apresenta como um produto inovador com potencial tecnológico e econômico.

7. Referências Bibliográficas

ANDRADE, Valci Rubens de Oliveira. **Antônio Lemos e as obras de melhoramentos urbanos em Belém: a Praça da República como estudo de caso.** 2003. Dissertação (Mestrado em Arquitetura) - Faculdade de Arquitetura e Urbanismo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico-solar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 38-41, 2003.

CARVALHO, C. R. L.; ROSSETTO, C. J.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; CASTRO, J. V. de; BORTOLETTO, N. Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo instituto agrônômico de Campinas comparadas a outras de importância comercial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 264-271, 8 ago. 2004.

COIMBRA, C. **Hearth Mango**. Organização Floresta Água do norte, 2016. Disponível em: <http://www.florestaaguadonorte.com.br/galeria-de-fotos-novembro-dezembro/fruta-de-quintal/manga%20cora%C3%A7%C3%A3o/english/>. Acesso em: 30/08/2017.

DONADIO, L. C. Variedades de mangueira. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MARTINS FILHO, J.; MORAIS, O. M. (Orgs.). **Manga tecnologia de produção e mercado**. Vitória da Conquista, Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, 1996, p. 32-56.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 557–569, 2009.

Jornalismo Ciência Ambiente. DUTRA, M. D. **Belém, cidade das mangueiras? Ou do calor que poderia ser mais ameno?** Jornalismo Ciência Ambiente, 2017. Disponível em: <http://blogmanueldutra.blogspot.com.br/search?q=MANGUEIRAS&submit=Pesquisar>. Acesso em: 27/08/2017.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1ª ed. Caxias do Sul, EDUCS, 2004. p.510.

FERREIRA, F. R.; POSSIDIO, E. L.; SOARES, N. B.; CASTRO NETO, M. T.; PINTO, A. C. Q.; DONADIO, L. C.; FREITAS, G. B. Germoplasma de manga no Brasil. In: Embrapa Semiárido. **O AGRONEGÓCIO manga: produção e mercado**. Vitória da Conquista, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2002. p.111-118.

GOBIRA, R. M.; GOBIRA, P. S. S. C.; MELLO, R. F. A. de; SILVA, G. C. T. da; MOREIRA, S. G. C.; ALCANTRA JÚNIOR, P. A. de; SANTOS, A. S. Development of analytical method, by spectroscopy in the midinfrared, and multivariate calibration for ethanol quantification in the fermented mango pulp (*Mangifera indica* L.) variety Bacuri. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 21., Aracaju. **Anais [...]**. Aracaju, 2017. ref. 58921.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. 1ªed. São Paulo, Livraria Nobel, 1972. p.446

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal iversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycol Res.**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

LIMA NETO, E. M.; SOUZA, R. M. e. Comportamento e características das espécies arbóreas nas áreas verdes públicas de Aracaju. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 7, n.1, p. 1-10, 2011.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo in natura. São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LOUREIRO, V. R.; BARBOSA, E. J. S. Cidade de Belém e natureza: uma relação problemática? **Periódicos UFPA**, v. 13, n.1, p. 105- 134, mar./maio, 2010.

MACIEL, Leonardo Fonseca. **Caracterização físico-química e avaliação de compostos bioativos de manga (*Mangifera indica* L.) provenientes de cultivo biodinâmico, orgânico e convencional**. 2009. Dissertação (Mestrado Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

MARQUES, A.; CHICAYBAM, G.; ARAUJO, M. T.; MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) CV. Tommy Atkins. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, dez. 2010.

MUKHERJEE, S. K. **Systematic and ecogeographic studies of crop genepools**. Rome, Italy, *Mangifera*, IBPGR, 1985. v. 1.

NARAIN, N.; ALMEIDA, J. N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S.; BRITO, E. S. Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* forma *Flavicarpa*) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 212-216, 2004.

NASCIMENTO, M.; AGUIAR, R.; MOUTINHO, T. Cidade de Belém. In: ENCONTRO CENTRO-OESTE E NORTE DOS GRUPOS PET (ECONPET). 2., 2010. **Anais [...]**. Belém: UFPA, 2010. p. 5-6.

OAKLEY, E. Quintais domésticos: uma responsabilidade cultural. **Agriculturas**, v. 1, n. 1, p. 37-39, nov. 2004,

O LIBERAL. Mangueiras são vítimas da colheita precoce de frutos. Belém, 01 out. 2017. Caderno 1, atualidades, p. 3.

PINA, M. G. M.; MAIA, G. A.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; FIGUEIREDO, R. W.; MONTEIRO, J. C. S. Processamento e conservação de manga por métodos combinados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p.63-66, abr. 2003.

PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Engenharia Biológica, Universidade de Minho, Braga, 2004.

PORTO, L. P. M. BRASIL, H.M. S. **Manual de orientação técnica da arborização urbana de Belém**. 2. ed. Belém, Prefeitura Municipal de Belém, 2013. p.108.

ROCHA, R. R.; BARBOSA, R. I. Árvores frutíferas nos quintais de Boa Vista Roraima, **Recursos Naturais Urbanos**, v. 3, n. 2, p.107-114, 2008.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B. *Metschnikowia cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. **Int J Syst Evol Micr.**, v. 57, p. 161-165, 2007.

SANTOS, Cristiane de Nazare Paes dos. **Elaboração de um estruturado de polpa de manga (*Mangifera indica* L. cv Tommy Atkins) parcialmente desidratada por osmose**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SILVA, D. A.; BIONDI, D.; BATISTA, A. C. Estrutura e distribuição espacial de mangueiras (*Mangifera indica* L.) nas ruas da cidade de Belém (PA). **Revista Geografar**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 5-21, dez. 2015.

SILVA JÚNIOR, M. C. da; LIMA, R. M. C. e. **100 árvores urbanas: guia de campo** Brasília, DF, Rede de Sementes do Cerrado, 2010. 280 p.

SILVA, L. M. G. **Doses e métodos de aplicação do paclobutrazol em mangueiras cv. Tommy Atkins**. 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Cruz das Almas, Bahia, 2000.

SINGH, L. B. **The Mango: botany, cultivation and utilization**. London, World Crops Books, Leonard Hill (books), 1960. 438 p.

SUGAI, Aurea Yuki. **Processamento descontínuo de purê de manga (*Mangifera indica* Linn.), variedade haden: estudo da viabilidade do produto para pronto consumo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

TEDJO, W.; TAIWO, K. A.; ESHTIAGHI, M. N.; KNORR, D. Comparison of pretreatment methods on water and solid diffusion kinetics of osmotically dehydrated mangos. **Journal of Food Engineering**, v. 53, n. 2, p. 133-142, 2002.

WINKLERPRINS, A. M. G. A. House-lot gardens in Santarém, Para, Brazil: linking rural with urban. **Urban Ecosystems**, v. 6, n. 1, p. 43-65, 2002.

CAPÍTULO 2

Caracterização da polpa de *Mangifera Indica L.* (var. Bacuri) para produção de Aguardente aromatizada

Resumo

A espécie botânica tropical *Mangifera indica L.* produz uma fruta muito consumida *in natura*, mas pouco explorada industrialmente nas formas desidratada, em cosméticos, cosmocêuticos ou produtos de fermentação; exceto como geleia, doce, suco e outras guloseimas. O Brasil por ser um dos maiores produtores desta fruta torna viável sua exportação e, por conseguinte, apenas a industrialização do suco tem maior visibilidade, o que abre caminho para maior aproveitamento deste fruto. Neste trabalho se busca conhecer as características químicas da polpa para viabilizar a produção de aguardente. A polpa da manga foi obtida no comércio local e foi caracterizada quanto a acidez expressa em gramas de ácido cítrico, sólidos solúveis totais (SST) expressa em °Brix, açúcares redutores totais, pH, composição química expressa em base de matéria seca, composição volátil e composição de açúcares fermentescíveis; as duas últimas foram analisadas por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas GC/MS. Essa variedade apresentou resultados incluídos no estabelecido pelo Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Manga. Na análise de composição volátil, obteve-se o α -terpinoleno e na de açúcares se obteve a sacarose como substâncias majoritárias.

Palavras-chave: Açúcares Fermentescíveis, Compostos Voláteis, Perfil Químico.

Abstract

The tropical botanical species *Mangifera indica L.* produces a fruit widely consumed *in natura*, but little exploited industrially in dehydrated forms, in cosmetics, cosmeceutics, or fermentation products; except as jelly, candy, juice, and other treats. Brazil, as one of the largest producers of this fruit, makes it export viable and, therefore, only the industrialization of the juice has greater visibility, which opens the way for greater utilization of this fruit. In this work, the chemical characteristics of the pulp are sought in order to make the production of brandy feasible. The mango pulp was obtained in local commerce and was characterized for acidity, expressed in grams of citric acid, total soluble solids (TSS) expressed in °Brix, total reducing sugars, pH, chemical composition expressed on a dry matter basis, volatile composition, and fermentable sugar composition; the last two were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry GC/MS. This variety presented results included in the established by the Technical Regulation for Setting Standards of Identity and Quality for Mango Pulp. In the volatile composition analysis, α -terpinolene was obtained and in the sugar analysis, sucrose was obtained as the majority substances.

Keywords: Fermentable Sugars, Volatile Compounds, Chemical Profile.

1. Introdução

A manga (*Mangifera indica* L.) pertence à família Anacardiaceae e está entre as frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional. É uma fruta com grande quantidade de polpa, de tamanho e formato variáveis, aroma e cor muito agradáveis, que faz parte do grupo das frutas tropicais de importância econômica, não só pela aparência exótica, mas também por ser uma rica fonte de carotenoides e carboidratos (BRANDÃO *et al.*, 2003), ácidos orgânicos, fenólicos, lipídios, vitaminas e sais minerais. Esta fruta apresenta características únicas e é produzida na Ásia, Américas e África, sendo a Ásia, representada pela Índia, China e Tailândia, o maior produtor mundial; e nas Américas, apenas o Brasil se destaca, como o maior produtor na América do sul, ficando atrás apenas do México, na América central (LEBAKA *et al.*, 2021). As principais variedades de mangas comerciais cultivadas no Brasil eram: “Tommy Atkins”, em maior quantidade, “Haden”, “Keitt”, “Van” “Dyke”, “Rosa”, “Ubá”, entre outras, (SANTOS FARAONI; MOTA RAMOS; CÉSAR STRINGHETA, 2009); entretanto, a partir de 2019, o Brasil começou a exportar outras variedades; em 2020, as variedades Tommy Atkins para o mercado americano e Kent, Keitt e Palmer para a Europa, atingindo o mercado externo com 243,2 mil toneladas (Portal Embrapa, 2021). Segundo o IBGE (PAM 2020 | Agência de Notícias | IBGE, 2021), a produção nacional atingiu 1,4 milhão de toneladas por ano e ressalta que no Norte brasileiro se atinge apenas 1,18 toneladas. Entretanto, segundo (O LIBERAL, 2021), entrevistando o maior conhecedor de frutas e sementes da Região norte do Brasil, ele destaca que a produção deve levar em consideração as produções domésticas, já que os órgãos oficiais só relatam produção em pomares com um mínimo de 50 plantas, e para se fazer uma comparação, somente a arborização de Belém produz entre 30 e 50 toneladas, o que pode variar no decorrer dos anos, o entrevistado ressalta ainda que as variedades Tommy, Keitt, Haden e Palmer, comercializadas em Belém, são produzidas nas regiões Nordeste e Sudeste, e, devido à alta demanda do mercado local, o Pará não exporta manga para o exterior. Entre os tipos ou variedades mais populares, ressaltam-se as variedades “bacuri”, “rachadinha” ou “boceta”, e “comum”, que apresentam pouco impacto econômico. Deste modo, destaca-se a variedade bacuri por apresentar alto teor de polpa e aroma agradável. Neste caso, poucos estudos foram realizados sobre as condições nutricionais e de composição química destas variedades, tendo maior destaque de exportação mundial as variedades “Tommy Atkins”, “Haden”, “Kent”, and “Keitt” (MALDONADO-CELIS *et al.*, 2019).

As características sensoriais, sabor e aroma, são muito dependentes de compostos orgânicos voláteis e não voláteis. O sabor é principalmente uma resposta integrada às sensações do gosto e do aroma. A sensação do gosto é atribuída à presença dos compostos não voláteis nos alimentos (tais como açúcares, sais, ácidos e limonina) determinando as quatro sensações básicas descritas como doce, salgado, azedo e amargo. A sensação do aroma é bem mais complexa, pois o olfato humano pode discriminar entre milhares de compostos voláteis. São os compostos voláteis os responsáveis pelo sabor característico dos alimentos (FRANCO *et al.*, 2004). No início dos anos 70 Bandyopadhyay e Gholap, (2002) mostraram que havia uma possível relação entre a intensidade do aroma e do sabor, sendo estes uma razão entre os ácidos palmítico e palmitoleico na polpa da manga madura. Isto poderia ser usado como um índice do aroma e do sabor das mangas. Deste modo, à medida que o índice se aproximava de 1, aroma e sabor se apresentavam forte, à medida que se aproximavam de zero, os mesmos se apresentavam fracos.

A composição química da manga varia com as condições de cultura, variedade, estágio de maturação, meio ambiente, mas em geral, a fruta *in natura* tem um alto teor de sólidos solúveis totais, pobre em fontes de minerais e o conteúdo de açúcares é alto se comparado a muitas frutas (SANTOS, 2003).

Em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* os meios de cultivo devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, além de sais e vitaminas (HORAK, 1997). Os principais compostos utilizados como fonte de carbono são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) ou dissacarídeos (maltose e sacarose). Quando a levedura é cultivada em meio contendo uma mistura de glicose e outros açúcares como sacarose, maltose ou galactose, o metabolismo é diáxico, ou seja, a glicose é preferencialmente utilizada, enquanto os outros açúcares somente serão metabolizados quando após a exaustão da glicose. (SILVEIRA, 2013)

A constituição volátil de manga é muito susceptível a variações, sendo influenciada por diversos fatores como variedade estudada, procedência geográfica, estágio de maturação, condições de conservação e o método de extração (SINGH *et al.*, 2004). Além disso, já foram detectadas diferenças na composição química das diferentes partes do fruto (casca e polpa: porções- interna, intermediária, externa, superior, meio e inferior do mesocarpo) (LALEL *et al.*, 2003). Em virtude disso, a constituição química da manga é muito complexa, tendo já sido identificados mais de 300 compostos, pertencentes às mais variadas classes, sendo encontrados tanto na forma livre ou como heterosídeos: terpenoides, ésteres etílicos de ácidos

graxos (C2 - C16), *g* e *d*-lactonas, bem como aldeídos, cetonas e álcoois alifáticos de cadeia curta (C2 -C6) (FRANCO 2003; SINGH *et al.*, 2004; PINO *et al.*, 2005). Mono e sesquiterpenóides representam cerca de 70-90% dos componentes voláteis de manga, os demais compostos conferem os odores peculiares ao aroma de cada cultivar (FRANCO, 2003; LEBAKA *et al.*, 2021).

A biossíntese de compostos voláteis também é fortemente afetada pelas mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o amadurecimento do fruto, tais como amaciamento da polpa, desenvolvimento de pigmentos, incremento na taxa de respiração e produção de etileno, alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios. Neste período, o qual dura entre 9 e 12 dias (dependendo da variedade e da maturidade no momento da colheita, entre outros fatores), (CANUTO *et al.*, 2009)

Diferença na composição dos voláteis de uma determinada fruta também pode ser devida à metodologia. O uso do calor durante o processo de isolamento das substâncias voláteis pode também estimular modificações na composição química. Além disso, voláteis ligados podem ser liberados, sob condições drásticas, como aquecimento (FRANCO e JANZANTTI, 2005; LI *et al.*, 2017).

A composição química da polpa deve apresentar características apreciáveis tais como teor ART, baixo teor de lipídeos e/ou fibras. Neste caso, além dos constituintes apreciáveis de carboidratos a polpa da manga apresenta outros componentes importantes, como o seu buquê aromático e açúcares fermentescíveis disponíveis para a fermentação. Neste sentido o desenvolvimento de um processo de produção de aguardente se apresenta como promissor e com potencial tecnológico para seu desenvolvimento.

2. Material e Métodos

2.1 Colheita do material Botânico:

A colheita da *Magifera indica L.* var. Bacuri acontecerá na cidade de Belém – PA no campus experimental da EMBRAPA – Amazônia Oriental nas coordenadas X: 01°14,42S - Y:48°26'35"O, os frutos serão coletados no estado de maturação avançado, despulpado, pesados e armazenados em sacos plásticos estéreis e congelados para análises posteriores. (SISGEN - A791890).

2.2 Processamento do fruto e obtenção da polpa

Inicialmente, os frutos foram lavados em água corrente para a eliminação de sujidades grosseiras aderidas à casca e, posteriormente, submetidos a um processo de desinfecção química em banho de hipoclorito de sódio de 100 ppm por 10 min. Após o procedimento de desinfecção, os frutos passaram por enxague com água destilada e foram despulpados manualmente. A polpa dos frutos foi processada em liquidificador e acondicionada em sacos plásticos de polietileno estéreis com capacidade de 2 litros, e armazenadas em freezer até a execução das análises e preparo do mosto para a realização das fermentações.

2.3 Caracterização da polpa

A polpa será caracterizada quanto:

2.3.1 Acidez Total Titulável (ATT): determinada por volumetria de neutralização com solução de NaOH 0,1 mol/L como titulante para o cálculo da acidez total titulável será utilizada a equação 1 os valores serão expressos em g de ácido cítrico por 100 mL de polpa de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

$$A = \frac{Vt \times fc \times N \times Eq}{10 \times Va} \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

A: acidez total titulável expressa em g de ácido cítrico em 100 mL de amostra;

Vt: volume gasto (mL) de solução de NaOH 0,1 mol . L⁻¹;

N: normalidade da solução de NaOH 0,1 mol . L⁻¹;

Fc: fator de correção da solução de NaOH;

Eq: equivalente grama do ácido cítrico (64,00)

Va: volume da amostra

2.3.2 Determinação de Sólidos Solúveis Totais (SST): por leitura direta em refratômetro manual Instrumento com escala de 0 a 32 °Brix e precisão de 0,2 °Brix. Essa determinação consiste na medida do índice de refração das soluções e sua conversão à porcentagem de sólidos solúveis totais expressos em °Brix, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

2.3.3 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART): foram determinados pelo método espectrofotométrico DNS (ácido 3-5 dinitrosalicílico) descrito por Miller (1959), e utilizado no LabISisBio com modificações, utilizando 100 µL de amostra, 200 µL de água deionizada e 300 µL de Reagente DNS (5 g de ácido 3,5 – dinitrossalicílico, 100 mL de NaOH 2N, 150g de sal de Rochelle (Tartarato de Sódio e Potássio)), após a mistura dos reagentes leva-se ao Banho-Maria a 100°C por 5 minutos, em seguida resfriado em água corrente e adicionado 1000 µL de água desionizada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-vis a 540nm, foram realizadas as determinações de absorvância, correlacionando os valores absorvâncias apresentadas pelas amostras, com a equação de reta extraída de uma Curva Padrão, construída a partir de uma solução de glicose (10g/L).

2.3.4 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH): determinado por leitura direta em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 de acordo com a metodologia descrita pela a AOAC (2007).

2.3.5 Determinação do Teor de Água: No procedimento foi utilizado o aparelho de Dean & Stark, cujo funcionamento é baseado no princípio da imiscibilidade de solventes, nesse caso o tolueno e água, de acordo Santos *et al.* (2004). O cálculo do teor de água (U%) será feito com o emprego da seguinte equação 2:

$$U = \frac{Va \times 10}{Pa} \quad (\text{equação 2})$$

onde,

Va = volume (mL) de água extraída da biomassa, lido na escala volumétrica do Dean & Stark.

Pa = peso da amostra (10 g).

100 = fator de conversão para porcentagem.

2.4. Composição Química expressa na base de matéria seca

As análises de Matéria Seca (MS), Matéria Mineral (MM), Nutrientes Digestivos Totais (NDT), Fibra de Detergente Neutra (FDN), Fibra de Detergente Ácida (FDA), Hemicelulose e Lignina; foram realizados em colaboração com a Professora Dr^a. Adriana

Lima Moro através do Laboratório de Bromatologia da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), seguindo o protocolo de Silva e Queiroz (2002)

2.5. Extração de voláteis

As substâncias voláteis foram extraídas pelo método de Destilação e Extração Simultânea (DES), utilizado o aparelho de Likens e Nickerson (1964).

2.6. Derivatização de açúcares assistida por microondas

Em um frasco de vidro de 2ml com tampa, tomou-se 3mg de hidroxilamina e dilui em 150 μ L de Piridina, na sequência, o conjunto foi submetido a agitação até a total dissolução dos cristais. Tomou-se 10mg da amostra em um frasco cônico de 2mL com tampa, adicionou 100 μ L de piridina e agitou a mistura em ultrassom a 30° C por 2min para dissolução dos cristais. Em seguida adicionar 150 μ L da solução de hidroxilamina. Acrescentou-se à mistura 25mg de sulfato de sódio anidro, homogeneizou em ultrassom por 1 minuto e em seguida centrifugou por 5 minutos a 8000rpm. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante (com micropipeta), transferiu para um frasco previamente seco e submeteu a reação por micro-ondas com 60% da potência durante 2 minutos. Na sequência, foram adicionados 200 μ L de anidrido acético e submetido a reação ao micro-ondas por 1 minuto, a 60% da potência. Retirou-se o sobrenadante e submeteu-se a análise por GC-MS (SÖDERHOLM, 2010).

2.7. Análise do Perfil dos açúcares e substâncias voláteis por GC/MS

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (CG) acoplado a um espectrômetro de massa (EM), equipado com coluna capilar DB-5(15m x 0,25mm x 0,1 μ m). O gás Hélio foi usado como carreador com fluxo de 1mL / min. O injetor operou a 220 °C e a rampa de temperatura do forno iniciou a 60°C até 246°C (3°C/min.), mantendo-se nesta temperatura por 30 min. O MS-ISQ operou com interface a 275 °C, fonte de ionização a 200 °C, com faixa de massa de 40 a 800 Da e varredura de 0,5 scan/s, Ionização eletrônica a 70 eV. As identificações das substâncias foram realizadas através da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST2011-WILEI2009 e ADAMS-2005. A quantificação foi realizada pelo cálculo normalização da área do pico.

2.8 Análise do perfil de carotenoides da polpa HPLC-DAD

2.8.1 Preparação das amostras

2.8.1.1 Amostra do padrão de β -caroteno

Foram dissolvidos 2 mg do padrão de β -caroteno (Sigma $p \geq 95\%$) em 1mL de solução composta por 500 μ L de ACN (grau espectroscópico) e 500 μ L de Acetato de etila/MeOH 2:1 (grau espectroscópico). Uma alíquota de 100 μ L foi transferida para um frasco de 1,5 mL, em seguida foram adicionados 900 μ L de solução ACN/OAcEt/MeOH (na mesma proporção inicial), resultando em um volume total de 1mL e concentração final de 200 ppm (200 μ g/mL) de β -caroteno.

2.8.1.2 Amostra da polpa de manga

Os carotenoides presentes na polpa foram extraídos por maceração dinâmica com agitação assistida por ultrassom. Foi utilizado 1g de polpa para 10 mL de solução de mesma composição daquela utilizada para a dissolução do padrão de β -caroteno. O sistema foi irradiado com ondas ultrassônicas por 10 min em uma lavadora ultrassônica, modelo USC-2800A (UNIQUE Ind. e Com. Ltda., Indaiatuba, Brasil), operando a 40kHz, potência de 130w e temperatura de 25 °C. Uma alíquota de 100 μ L desta solução foi transferida para um frasco de 1,5 mL, em seguida foi adicionado o volume de solução necessária para completar 1mL.

2.8.2 Análise por HPLC-DAD

O método para a análise do perfil de carotenóides por CLAE foi adaptado de Rodriguez-Amaya (2001). Foi utilizado um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV-Vis de arranjo de fotodiodos, modelo CBM-20A (Shimadzu, Tokio, Japão), com sistema binário de bombeamento de solventes, desgaseificador “on line”, DGU-20A (Shimadzu, Tokio, Japão) com autoamostrador, modelo SIL-20 (Shimadzu, Tokio, Japão) e sistema de aquisição e processamento de dados LCMS-Solutions (Shimadzu, Tokio, Japão). A Coluna foi uma Kromasil ODS-5-C18, 4,6x150mm, 5 μ m (Kromasil, Bohus, Suíça) de fase reversa, mantida em forno a uma temperatura de 28°C. Os espectros de absorção foram registrados na faixa entre 200 a 800nm e o cromatograma processado em 450nm. A eluição foi realizada em modo isocrático com fase móvel consistindo em uma mistura dos solventes acetonitrila (ACN), acetato de etila (EtOAc) e metanol (MeOH) na proporção de 24:2:1. O tempo total de análise foi de 60 min a um fluxo da fase móvel de 0,90mL/min. Volume de injeção das amostras foi de 10 μ L.

2.9. Identificação dos carotenoides

Os carotenoides (em particular o β -caroteno) foram localizados nos cromatogramas pelos tempos de retenção e espectros de absorção na região visível, considerando tanto os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) quanto a estrutura espectral fina, expressa em % III/II. A % III/II é a razão entre a altura do pico de absorção no comprimento de onda mais longo (III) e o pico intermediário (II), tomando o mínimo entre os dois picos como linha de base, multiplicada por 100 (BRITTON, 1995). A identificação conclusiva dos carotenoides, foi realizada por Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, utilizando em conjunto os dados de tempo de retenção, co-cromatografia com carotenóides autênticos, espectro de absorção no visível, reações químicas de acetilação, metilação e espectrometria de massas.

3. Resultados e Discussão

A perspectiva de produção de aguardente a partir da polpa de manga variedade bacuri, denota uma preocupação no que tange a fonte de matéria-prima e sua qualidade. Deste modo, o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Manga (MAPA, “PORTARIA No 58, DE 30 DE AGOSTO DE 2016 - Imprensa Nacional,”), estabelece parâmetros físico-químicos mínimos como: pH; sólidos solúveis totais em °Brix a 20°C; acidez total expressa em ácido cítrico (g/100g), por este motivo, se comparou estes parâmetros, Tabela 1, e observou-se que os resultados demonstram que as características químicas para a variedade bacuri estão enquadradas no mínimo estabelecido pela legislação.

Tabela 1. Tabela de Caracterização da Polpa da Manga

Parâmetros analisados	Manga Bacuri	Padrão Referência
Acidez Titulável (g/100mL)	0,31	0,30
Sólidos Solúveis Total (SST) (° Brix)	13	12
Açúcares Redutores Totais (ART)(g/L)	6,58	-
pH	3,49	3,50
Umidade (%)	85	-

Poucos são os estudos envolvendo a variedade bacuri e por este motivo, os estudos aqui apresentados vem ao encontro de preencher algumas lacunas sobre estas características. Cordeiro, Mattietto e Lopes (2009) ao estudarem essa variedade mostraram em seus

resultados que a manga bacuri é mais ácida (pH 4,19; acidez 0,35%) em comparação a manga comum (pH 4,67; acidez 0,17%). Os teores de açúcares totais e redutores para manga comum e manga bacuri foram 10,80 e 5,10 g/100g; 11,31 e 4,47g/100g, respectivamente. Os percentuais de sólidos solúveis totais foram muito próximos, 13,5°Brix para a manga comum e 13,3°Brix para manga bacuri. Os resultados do teor de umidade se mostraram os mesmos para ambas as variedades (médias de 85%).

Ressalta-se que o Brasil é um grande produtor de manga, mas ainda se localiza na 9ª posição mundial. Deste modo, como fonte de matéria-prima para produção de aguardente, a manga se apresenta com potencial modesto. Na Tabela 2, ressalta-se que os números oficiais publicados, (IBGE-Portal do IBGE-SIDRA, 2020), destacam as produções no Brasil e nas suas regiões. Observa-se que são descritas as produções nos principais estados destas regiões, onde o Estado do Pará, que produz a variedade de manga bacuri, se apresenta com valores muito modestos, o que não é um estímulo para produção em larga escala, mas poder-se-á ressaltar o produto como uma iguaria artesanal. Por outro lado, a mesma tabela demonstra que as variedades comerciais apresentam boas produções em todas as regiões brasileiras, e que poderão ser usadas como fonte de fermentação para a geração deste produto.

Tabela 2. Produção de manga no Brasil, nas suas regiões e principais Estados

Localização	2016	2017	2018	2019	2020
Brasil	1.094.358	1.089.882	1.320.458	1.421.057	1.569.011
Região Norte	1.075	5.040	1.235	1.183	2.032
Estado do Pará	450	449	434	203	88
Região Nordeste	802.120	815.070	1.006.580	1.100.614	1.230.995
Estado da Bahia	443.639	438.603	378.362	442.233	470.487
Região Sudeste	280.299	260.312	302.641	308.765	324.152
Estado de São Paulo	178.722	176.127	202.328	206.854	217.213
Região Sul	7.974	6.877	7.118	6.955	7.428
Estado do Rio G. Sul	1.189	1.170	862	827	826
Região Centro Oeste	2.890	2.583	2.884	3.540	4.404
Estado do Mato Grosso	1.393	1398	1.398	1.372	1295

Fonte: IBGE-Portal do IBGE-SIDRA, 2020

Toneladas/ano.

Os perfis de caracterização também se assemelham aos relatados na literatura para outras variedades. A manga variedade Tommy apresentou umidade de 82% e açúcares redutores de 4,13 (COSTA *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2010) a variedade Ubá apresentou valores mais elevados como pH 4,21, SST 19, ART 0,63 (DAIHA BENEVIDES *et al.*, 2008;

RUFINI *et al.*, 2011), o que descreve uma variabilidade em decorrência dos fatores ambientais, e possivelmente, do grau de maturação, o qual não se tem parâmetros para comparação.

Dentro dos aspectos minerais, matéria seca, nutrientes digestivos e fibras, pode-se afirmar que a variedade bacuri (tabela 3) apresenta valores inferiores quando comparados com a variedade Tommy cultivada em Cuiarana no Estado do Pará. Estes parâmetros expressos em base de matéria seca para manga madura apresentaram valores superiores aos da manga bacuri; onde somente a FDN apresentou valor inferior (FONSECA *et al.*, 2017).

Tabela 3. Composição Química, na base de matéria seca da manga bacuri

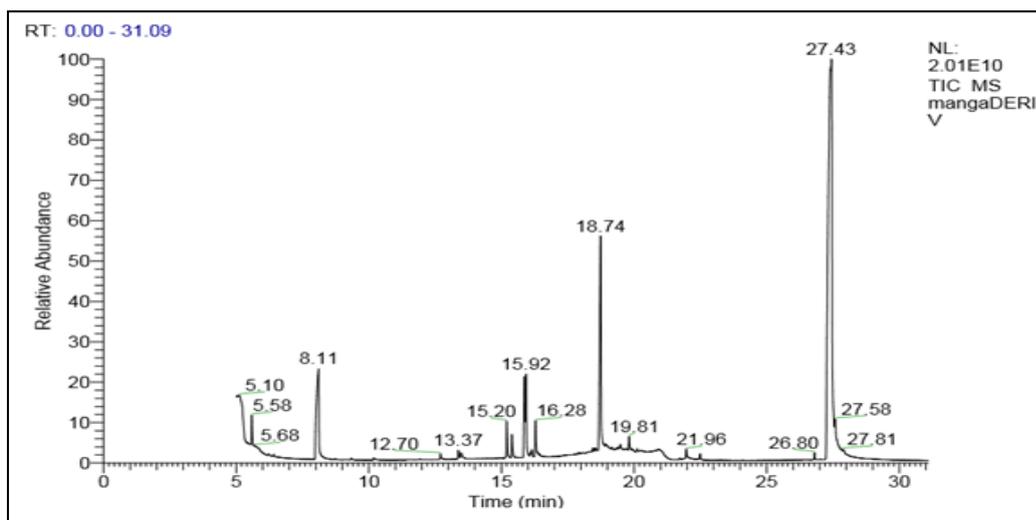
	MS (%)	MM (%)	NDT (%)	FDN (%)	FDA (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
tommy	74,94	2,22	81,59	10,14	9,39	0,73	3,44
bacuri	12	1,65	-	20,46	4,12	-	-

MS = Matéria Seca/ MM = Matéria Mineral/ NDT = Nutrientes Digestivos Totais (Estimado)/ FDN = Fibra Detergente Neutra/ FDA = Fibra Desnaturante Ácida.

Dentre outros aspectos a manga varia consideravelmente em tamanho, forma, cor, presença de fibras, aroma e sabor. As fibras alimentares pela sua composição (polissacarídeos, lignina, oligossacarídeos, amido resistente, dentre outras substâncias), apresentam propriedades funcionais aplicáveis à indústria de alimentos, podendo ser aproveitada na produção de diferentes produtos como bebidas, sobremesas, derivados do leite, biscoitos, massas e pães (GIUNTINI; LAJOLO; MENEZES, 2003).

O perfil cromatográfico dos sacarídeos presentes na polpa da manga apresenta a sacarose como açúcar principal, destacando também as presenças de glicose e frutose, devido a hidrólise do sacarídeo principal. A **figura 1** é referente ao perfil de açúcares do fruto da variedade Bacuri, no qual a sacarose foi a substância com maior concentração na análise realizada. Neste ambiente, observam-se também as presenças de maltose, o que é comum nos frutos tropicais, assim como de mio inositol. Entretanto, derivados do ácido propanóico e 1,2,3,4 propanotetrol não são comuns, podendo ter surgido em função da decomposição da frutose, durante a derivatização. Em geral, glicose e frutose estão ligadas na forma de sacarose.

Figura 1. Perfil Cromatográfico dos carboidratos da manga bacuri



A **tabela 4** está listado as substâncias detectadas com seus respectivos tempos de retenção (t_r) e valor percentual de área relativa.

Tabela 4. Composição de açúcares da manga bacuri

Constituinte	IR	%Área
	5.58; 5.10;	1.9
Derivatizing debris	13.37	
Propanoic acid derivative	8.11	10.0
1,2,3,4-butanetetrol (Isom)	15.2	1.5
1,2,3,4-butanetetrol (Isom)	15.39	1.1
Furanose derivative	15.92	7.3
d-arabinose	16.28	2.0
d-glucose	18.74	12.9
allo-inositol	19.81	0.8
Maltose	21.96	0.6
Sucrose	27.43	61.9

IR: Índice de retenção.

Muitas das aplicações industriais de leveduras *Saccharomyces* dependem da fermentação eficiente de sacarose ou dos hidrolisados de amido ricos em α glicosídeos maltose e maltotriose, inclusive glicose (DEVANTIER *et al.*, 2005). Na indústria cervejeira, por exemplo, estes dois açúcares são de especial importância uma vez que são os açúcares predominantes no mosto (tipicamente 50-60% é maltose, maltotriose é de 15-20%), seguido pela glicose (10-15%) e outros carboidratos minoritários (ERNANDES *et al.*, 1993). Destes

açúcares, a glicose é preferencial e rapidamente utilizada por células de levedura, mas tanto a eficiência do processo e qualidade do produto requer a utilização completa de todos os açúcares, incluindo maltose e maltotriose. Embora maltose seja facilmente fermentada pela maioria das linhagens de levedura, ela só ocorre após a exaustão da glicose.

A análise dos compostos voláteis presentes na amostra de manga descreve um perfil químico muito interessante, pois a principal substância é o α -terpinoleno, a qual se destaca pela conotação de odores que variam desde o floral até o herbal. Neste aspecto, aromas com características refrescantes e presentes na matéria prima podem se sobressair no produto de destilação, como é o caso de bebidas destiladas, produzidas a partir da fermentação de matérias primas ricas neste tipo de composto. O segundo composto em concentração majoritária é o delta-3-careno, que confere o odor pungente adocicado, característico da manga, que atribui o pigarro; algumas vezes mais acentuadas outras vezes menos acentuadas. A **tabela 5** apresenta o perfil de voláteis detectados na variedade de manga bacuri.

Figura 2. Cromatograma dos Compostos Voláteis da Manga Bacuri

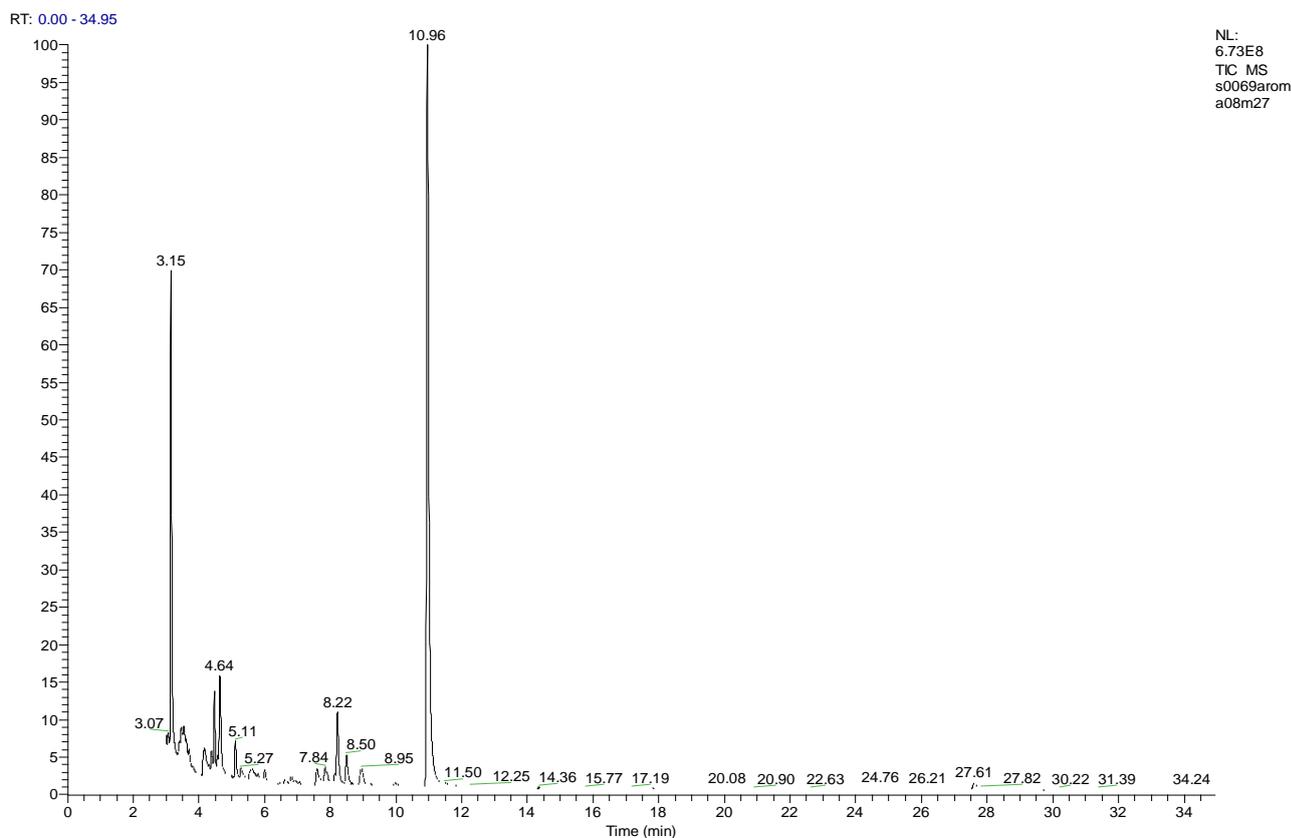


Tabela 5. Composição Volátil da manga variedade bacuri

Constituinte	TR	%Area
1-penten-3-ol	3.46	3.4
3-hexeno-2,5-diol	3.54	4.4
Nonano	4.17	3.6
2-metil-2-ciclopentenona	5.59	4.3
α -mirceno	7.59	4.6
<i>n</i> -decano	7.84	4.5
δ -3-careno	8.22	7.9
α -terpineno	8.5	5.3
α -felandreno	8.95	4.7
α -terpinoleno	10.96	53.5
α -guaieno	27.61	3.7

IR: Índice de retenção.

Pino *et al.* (2005) analisou por CG/EM o aroma de 20 variedades de mangas extraídos por destilação simultânea (EDS). O terpinoleno foi detectado em todas as variedades e numa quantidade considerável em três delas, também denominadas de cultivares (cvs): Obispo, Corazón e Huevo de toro; o δ -3-careno também encontrado em todas as variedades foi mais expressivo nas variedades: Haden, Amarilla, Macho, Blanca, San Diego, Manzano, Smith, Flórida, Keitt e Kent. De um modo geral os hidrocarbonetos terpênicos são mais comuns e se apresentam em maiores quantidades nos aromas de manga, como mostrado em diversos estudos (LI *et al.*, 2017).

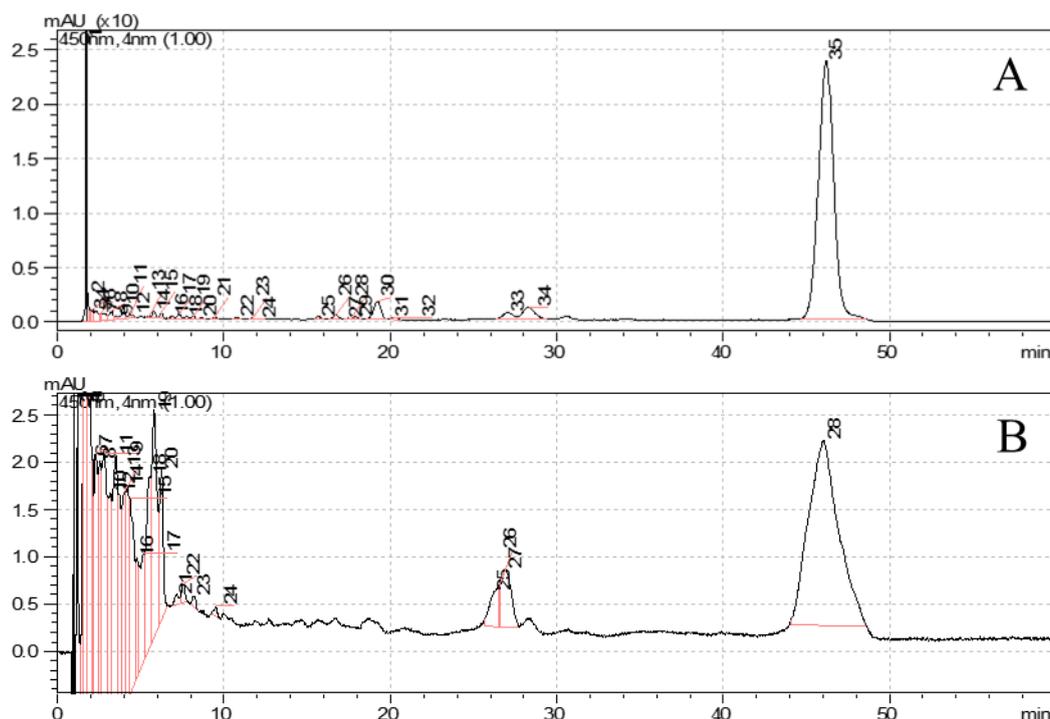
Andrade *et al.* (2000), ao estudar a composição volátil de 15 variedades de mangas extraída por arraste de vapor, detectou e quantificou o terpinoleno, o qual estava presente em 13 variedades, sendo que a variedade Bacuri apresentou 57% de sua constituição; nesta mesma bateria de análises o δ -3-careno estava presente em 12 variedades e na variedade Bacuri representou 7,1% de sua constituição. No estudo de Franco *et al.* (2004) os compostos voláteis de três cultivares de mangas: Haden, Tommy-Atkins e Keitt, procedentes do Estado de São Paulo, foram isolados por uma técnica de headspace dinâmico, envolvendo sucção em polímero poroso. Os hidrocarbonetos monoterpênicos foram os compostos mais abundantes no headspace das amostras, onde δ -3-Careno foi o componente majoritário dos cultivares Haden e Keitt, enquanto a Tommy-Atkins mostrou predominâncias de δ -3-careno e α -pineno. Outros compostos identificados foram: α -fencheno, α -canfeno, *p*-cimeno, β -mirceno, β -felandreno, limoneno, α -terpinoleno, β -cariofileno e α -humuleno.

Canuto *et al.* (2010) ao estudar a composição volátil da manga variedade Tommy-Atkins extraídos por SPME (microextração por fase-sólida) e analisados por CG/EM, mostrou

que o aroma foi constituído basicamente por monoterpenos, sendo δ -3-careno o composto majoritário. Nestes estudos, além do tipo de técnica empregada, outros fatores podem justificar as diferenças observadas, tais como procedência geográfica dos frutos e parte do fruto analisada (polpa com ou sem casca). É fato também que a subjetividade da avaliação do estágio de maturação torna esta classificação difícil e imprecisa, particularmente, na fase final de amadurecimento, quando ocorrem transformações químicas rápidas e profundas. As cascas dos frutos sempre acumulam maior quantidade de voláteis, devido a proteção que estes metabólitos secundários exercem contra micro-organismos e insetos, principalmente (GALSURKER *et al.*, 2020).

O fruto da mangueira denominado de manga apresenta coloração amarela alaranjada ou vermelho-amarelada devido à presença de β -caroteno, uma pró-vitamina-A que apresenta importante propriedade biológica. Neste caso, o estudo realizado na manga bacuri apresenta o β -caroteno como a substância majoritária na polpa desta fruta, especificamente na fração lipídica, Figura 3.

Figura 3. Cromatogramas: padrão de β -caroteno (A); extrato obtido da polpa (B).



Os picos foram identificados a partir dos dados dos espectros de absorção típicos, na faixa do UV-vis, entre 200 – 800 nm, seguindo o procedimento descrito na seção 2.8.3.

O pico 28 (cromatograma B) pôde ser identificado como sendo o β -caroteno por comparação seu tempo de retenção com o do pico 35 (cromatograma A), referente ao padrão de β -caroteno, área percentual relativa e espectro de absorção na região do visível, entre 340 – 600nm. Os picos minoritários observados no cromatograma B não puderam ser identificados com exatidão aceitáveis devidos seus espectros de absorção se mostrar muito ruidosos e não apresentarem definição em sua estrutura fina, este fato impossibilitou se fazer qualquer inferência sobre a identificação destas substâncias. O cromatograma B mostra que o β -caroteno é o carotenoide maioritário encontrado na polpa da manga estudada.

Estas informações ressaltam que a polpa de manga variedade bacuri apresenta potencial para ser usada em fermentação submersa visando a produção de aguardente. Neste contexto, estudos preliminares mostraram que a polpa apresenta teor de açúcares fermentescíveis, além de fibras hidrolisáveis que podem participar na conversão alcoólica, assim como voláteis que caracterizam sabor e odor diferenciados para um produto tão especial, como é o caso de aguardentes. Neste mesmo sentido, a produção de manga no Brasil reflete uma fonte potencial que poderá ser usada na produção artesanal de um produto nobre diferenciado.

4. Conclusões

Os resultados da composição química da polpa da manga bacuri apresentaram constituintes como carboidratos e voláteis apreciáveis para o desenvolvimento de um processo de produção de aguardente aromatizada, entretanto, a produção dos últimos cinco anos mostra um decréscimo na produção desta variedade estudada como fonte de matéria-prima, indicando a necessidade de intensificar na cultura desta variedade. Neste mesmo sentido, ressalta-se que ainda é possível se alavancar uma proposta de produção artesanal como iguaria, já que esta variedade é uma raridade, quando se compara suas características organolépticas e físico-químicas.

5. Referências Bibliográficas

ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. H. G. S.; ZOGHBI, M. das G. B. Aroma Volatile Constituents of Brazilian varieties of mango fruit. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 27 -33, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2007.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2004.

BANDYOPADHYAY, C.; GHOLAP, A. S. Changes in fatty acids in ripening mango pulp (var Alphonso). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 496–497, 1 maio 2002.

BENEVIDES, S. D.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; CASTRO, V. C. Quality of the fruits and pulp of Ubá mango. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 571-578, 2008.

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico solar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1. dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Leis, Decretos, etc. Portaria N° 58, de 30 de agosto de 2016. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas. **Diário Oficial da União**, n. 169, Brasília, 1 set. 2016. Seção 1, p. 2-10.

BRASIL. **Portaria N° 58, de 30 de agosto de 2016**. 2016. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/21291257. Acesso em: 20/10/2021.

CANUTO, K. M.; NETO, M. A. de S.; GARRUT, D. dos S. Composição química volátil, em diferentes estádios de maturação, de manga ‘Tommy Atkins’ produzida no Vale do São Francisco. **Quím. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2377-2381, 2009.

CANUTO, K. M.; SOUSA NETO, M. A. de; GARRUT, D. dos S.; LIMA, M. A. C. de. Evaluation of the use of ethylene inhibitors on production of volatile compounds and mangifen in mango fruit. **Quím. Nova**, v. 33, n. 7, p.1535-1540. 2010.

CORDEIRO, B. S.; MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S. Caracterização físico-química da manga comum e manga bacuri oriundas do Estado do Pará. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 8., 2009, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: Unicamp, 2009.

COSTA, J. D. de S. *et al.* Componentes principais de parâmetros físico-químicos de mangas cv. Tommy atkins durante a maturação. **Espacios**, v. 38, n. 16, 2017.

BENEVIDES, S. D.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; CASTRO, V. C. Qualidade da manga e polpa da manga Ubá Quality of the fruits and pulp of Ubá mango. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 28, n. 3, p. 571–578, 2008.

DEVANTIER, R.; SCHEITHAUER, B.; VILLAS-BÔAS, S. G.; PEDERSEN S.; OLSSON, L. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 90, n. 6, p. 703-714, 2005.

EMBRAPA. **Exportação de manga brasileira bate recorde em 2020, totalizando US\$ 246 milhões.** 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/60585117/exportacao-de-manga-brasileira-bate-recorde-em-2020-totalizando-us-246-milhoes>. Acesso em: 17/10/2021.

ERNANDES, J. R.; WILLIAMS, J. W.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Effect of yeast adaptation to maltose utilization on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. **J. Inst. Brew.**, v. 99, n. 1, p. 67-71, 1993.

FARAONI, A. S.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C. Caracterização da manga orgânica cultivar ubá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n. 1, p.9-14, 2009.

FONSECA, L. A. B. da; GUIMARÃES, B. E.; LEITE, B. K. V.; RODRIGUES, J. C.; LIMA, K. R.L de S.; SOUSA, A. M. L. Composição química da manga tomyatkins (mangifera indica l.) E potencial de uso na alimentação animal. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA DA AMAZÔNIA, 4., **Anais [...]**. Paragominas: EDUFRA, 2017.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais.** São Paulo, Livraria Varela, 2003.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour Fragr. J.** v. 20, p. 358–371, 2005.

FRANCO, M.R.B.; RODRIGUEZ-AMAYA D.; LANÇAS, F. M. Compostos Voláteis de Três Cultivares de Manga (Mangifera indica L.). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 165-169, 2004.

GALSURKER, O. *et al.* Harvesting mango fruit with a short stem-end altered endophytic microbiome and reduce stem-end rot. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2020.

GIUNTINI, E. B.; LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Potencial de fibra alimentar em países ibero-americanos: alimentos, produtos e resíduos. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, v. 53, n. 1, p. 14-20, 2003.

HORAK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.**, v. 1331, n. 1, p. 41-79, 1997.

IBGE. **PAM 2020: valor da produção agrícola nacional cresce 30,4% e chega a R\$ 470,5 bilhões, recorde da série.** Agência de Notícias do IBGE. 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de->

noticias/releases/31672-pam-2020-valor-da-producao-agricola-nacional-cresce-30-4-e-
chega-a-r-470-5-bilhoes-recorde-da-serie. Acesso em: 17/10/2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**: métodos químicos e físicos para alimentos. 4. ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LALEL, H. J. D.; SINGH, Z.; TAN, S. C.; J. Distribution of aroma volatile compounds in different parts of mango fruit. **Hort. Sci. Biotechnol.**, p. 131-131, 27 oct. 2002.

LEBAKA, V. R. *et al.* Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 1–20, 2 jan. 2021.

LI, L. *et al.* Profiling of volatile fragrant components in a mini-core collection of mango germplasms from seven countries. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.

MALDONADO-CELIS, M. E. *et al.* Chemical Composition of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit: Nutritional and Phytochemical Compounds. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1073, 17 out. 2019.

MARQUES, A. *et al.* Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1206–1210, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. **Anal Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PINO, J. A.; MESA, J.; MUÑOZ, Y.; MARTÍ, M. P.; MARBOT, R. Volatile Components from Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 2213–2223, 2005.

RUFINI, J. C. M. *et al.* Caracterização biométrica e físico-química dos frutos de acessos de manga ‘Ubá’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 456-464, jun. 2011.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M; FIGUEIREDO, F. J. C.; NETO, O. G. da R. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico 99**. Belém, EMBRAPA, 2004.

SANTOS, Cristiane de Nazare Paes dos. **Elaboração de um estruturado de polpa de manga (*Mangifera indica* L. cv Tommy Atkins) parcialmente desidratada por osmose**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SINGH, Z.; LALEL, H. J. D.; NAIR, S. A Review of mango fruit aroma volatile compounds - state of the art research. **Acta Hort.** (ISHS), v. 645, p. 519-527, 2004.

SILVA, D. J.; QUEIRÓZ, A. C. **Análise de alimentos métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, UFV, 2002.

SILVEIRA, Erick de Abreu. **Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2013.

SÖDERHOLM, S. L.; DAMM, M.; KAPPE, C. O. Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis. **Molecular Diversity**, v. 14, p. 869-888, 2010.

VAZ, E. No Brasil, manga bate recorde de produção e exportação. Economia. **O Liberal**. 2021. Disponível em: <https://www.oliberal.com/economia/no-brasil-manga-bate-recorde-de-producao-e-exportacao-1.376646>. Acesso em: 17/10/2021.

CAPÍTULO 3

Isolamento e identificação molecular de leveduras naturalmente ocorrentes em polpa de *Mangifera indica* L. var. bacuri.

Aguardando Submissão em Revista

Resumo

As leveduras naturalmente ocorrentes em seu substrato natural têm maior potencial do que as não ocorrentes para gerar bebidas alcoólicas, quando aplicadas estratégias específicas para sua seleção. Neste trabalho, as leveduras foram isoladas e identificadas durante a fermentação espontânea da polpa de manga (*Mangifera indica* L. var. bacuri) para estudar o perfil microbiano na busca de cepas de leveduras novas ou conhecidas, com potencial de fermentar açúcares de frutas exóticas para gerar aguardente. Aliquotas de 1mL foram retiradas do meio a cada 24h, durante 7 dias. Procedimento para contagem e isolamento das colônias de leveduras foram realizadas de acordo com suas morfologias e tipos representativos, aplicando-se diluições sucessivas até 10^{-7} UFC/mL em solução salina 0,9% e estriadas em meio GPY-agar, e incubadas por 3 dias a 30°C. Um total de 80 colônias puras foram obtidas, seguidas de extração e purificação do ADN pelo método fenol-clorofórmio. PCR simples e a sequência de amplificação dos iniciadores genéticos ITS-1, 5S e ITS-4 permitiram a análise das sequências demonstrando uma alta identidade com *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida haemulonii*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Meyerozyma guilliermondii* sequências.

Palavras-chave: Manga; perfil microbiano; aguardente; fermentação.

Abstract

Yeasts naturally occurring in their natural substrate have greater potential than non-occurring ones to generate alcoholic beverages, when specific strategies for their selection are applied. In this work, yeasts were isolated and identified during spontaneous fermentation of mango (*Mangifera indica* L. var. bacuri) pulp to study the microbial profile in the search for new or known yeast strains with potential to ferment exotic fruit sugars to generate spirits. Aliquots

of 1mL were taken from the medium every 24h for 7 days. Procedure for counting and isolation of yeast colonies were performed according to their morphologies and representative types by applying successive dilutions up to 10^{-7} UFC/mL in 0.9% saline and streaked on GPY-agar medium, and incubated for 3 days at 30°C. A total of 80 pure colonies were obtained, followed by DNA extraction and purification by the phenol-chloroform method. Simple PCR and amplification sequencing of the ITS-1, 5S and ITS-4 gene primers allowed analysis of the sequences demonstrating high identity with *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida haemulonii*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Meyerozyma guilliermondii* sequences.

Keywords: Mango; microbial profile; spirit; fermentation.

1. Introdução

Manga, *Mangifera indica* L., são frutas que têm características organolépticas, são vistosas e coloridas, apresentam cheiro e sabor acentuados. Seu aroma e cor associados à alta concentração de açúcares fazem com que sejam mais detectáveis, apreciáveis e degustáveis. No entanto, sob o clima tropical, estas características aumentam a sua perecibilidade, amadurecendo entre o 6º e o 7º dia, tornando-se impróprias para o consumo em 15 dias após a colheita (TAFOLLA-ARELLANO *et al.*, 2017). Nesta fase, há um amolecimento excessivo e colonização microbiana, o que dificulta a sua comercialização. Entretanto, devido a sua concentração de açúcar, 18-20% m/m (REDDY e REDDY, 2011) a polpa pode ser processada e transformada em produtos com valor agregado. Nesta direção, a produção de aguardente aromatizada é uma alternativa economicamente viável para aproveitar a demanda não comercial e o excedente do fruto (LUZÓN-QUINTANA; CASTRO; DURÁN-GUERRERO, 2021).

A composição química da manga, em geral, é formada de substâncias das classe dos fenólicos, terpenos, carotenos, lipídios, ceras e compostos voláteis; seguida de suas características organolépticas, que envolve a acidez, doçura, textura e aroma; têm grande influência nas colônias de microorganismos da polpa (MALDONADO-CELIS *et al.*, 2019). A composição dos frutos varia de acordo com suas variedades botânicas, condições de cultivo e estágios de maturação. A polpa de manga *in natura* apresenta de 12 a 16% m/m de sólidos solúveis; incluindo açúcares, ácidos, vitaminas, pectina e sais. A alta atividade da água (aw), que varia de 0,982 a 0,990, favorece a colonização de leveduras, fungos filamentosos e bactérias lácticas, assim como bactérias patogênicas (CRUZ *et al.*, 2019).

A levedura presente na microbiota dos frutos em decomposição é o micro-organismo

predominante, devido à sua tolerância à alta acidez e à sua capacidade de crescimento anaeróbico (FOSTER e VASAVADA, 2003). Este comportamento influencia o desenvolvimento do processo de fermentação devido às diversas espécies de leveduras geradas, que são responsáveis pela determinação do odor e sabor do produto final. Estas colônias de leveduras apresentam uma adaptabilidade excepcional num processo biotecnológico com elevada concentração de açúcar, especialmente as que possuem fibras solúveis. Neste caso, este tipo de levedura deve ser cuidadosamente selecionado, com base em sua adaptabilidade na fonte do substrato. Portanto, devido a sua alta capacidade de fermentação, a levedura é essencial no processo de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas (MELO *et al.*, 2007).

A *Saccharomyces cerevisiae* é universalmente empregada na produção de bebidas alcoólicas, em particular, a aguardente brasileira, a partir da fermentação da cana de açúcar (RESENDE OLIVEIRA *et al.*, 2018). A utilização de leveduras selecionadas, especialmente a *S. cerevisiae*, nas unidades de produção de fermentação é uma alternativa aos processos tradicionais, com uso de agentes biológicos naturalmente ocorrentes, na tentativa de controlar o processo de fermentação da aguardente, bem como o uso de linhagens de leveduras naturalmente ocorrentes que apresentam potencial de fermentação a partir de substratos específicos, como a polpa de manga. Para a produção de aguardente é notável que a fermentação por seleção de leveduras apresentem várias vantagens sobre a fermentação espontânea, como a minimização da contaminação, redução do tempo de fermentação, alto rendimento alcoólico, qualidade e produção uniforme (FREITAS SCHWAN *et al.*, 2001; MALDONADO-CELIS *et al.*, 2019).

A capacidade das leveduras de assimilar um grande número de substratos orgânicos expande sua capacidade de dispersão e ocupação em nichos ecológicos que contêm esses substratos. Portanto, leveduras dos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Sporobolomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Bullera*, *Torulaspora*, *Rhodotorula* e *Zygosaccharomyces* são bem diferenciadas com potenciais para a produção de diversas enzimas, tais como celulases, pectinases, lipases, proteases, xilanase e várias outras que atuam em substratos diversificados nos nichos ecológicos, ressaltando assim as ferramentas bioquímicas produzidas, através das habilidades potenciais destes agentes biológicas, para uso industrial (CRUZ *et al.*, 2019; LISZKOWSKA e BERLOWSKA, 2021).

Como a maioria das espécies de leveduras não apresenta características patogênicas, e seu uso se tornou mais fácil na indústria (CRUZ *et al.*, 2019; STEENSELS *et al.*, 2014),

especificamente, a microbiota de frutas comestíveis, se ressalta este aspecto como uma grande perspectiva de uso. Neste sentido, a manga apresenta uma microbiota favorável ao uso industrial e, portanto, foram os estudos preliminares planejados (BUENROSTRO-FIGUEROA *et al.*, 2018); (SURESH, ONKARAYYA, ETHIRAJ, 1982), que identificaram as espécies *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, *Candida sorbose*, *Candida tropicalis*, e *Candida diversa*. Notadamente, a presença de *Candida* spp. não é uma boa característica, e possivelmente, isto é o que não dá o impulso certo para o uso desta fonte como matéria-prima para novos produtos de fermentação. No entanto, o presente estudo baseia-se no fato dos microrganismos naturais (endófitos) das frutas terem uma grande capacidade de assimilação das polpas de manga como substratos. Portanto, a presença das *Candida* spp. contribui para o sinergismo do processo, e o produto obtido é destilado e não carrega o agente biológico após o processamento.

Neste estudo, foi intensificada a identificação de microrganismos que ocorrem naturalmente na polpa de manga durante a sua fermentação. É de salientar que, geralmente, a identificação de leveduras, por metodologia tradicional, é baseada na morfologia celular, em reações que ocorrem durante uma fermentação padronizada e em testes de assimilação de compostos definidos (KURTZMAN e FELL, 1998). Atualmente, estudos de diversidade e taxonomia microbiana são desenvolvidos com base no conhecimento atual da taxonomia polifásica, que integra diferentes dados e informações de análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas para caracterizar o microorganismo estudado (GAROFALO *et al.*, 2018).

Neste contexto, a identificação de espécies de microrganismos se baseia na obtenção de material genético (DNA), que pode ser analisado através da aplicação de técnicas moleculares rápidas como a Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP). que é uma técnica que permite obter várias cópias de um determinado segmento de DNA, desde quantidades mínimas, até ciclos repetidos de síntese mediados por primers sintéticos, baseados no mecanismo utilizado pelas células durante a replicação (KHOO *et al.*, 2020). Estas técnicas têm maior segurança e certificação quando o microorganismo já é conhecido ou quando realizado simultaneamente à identificação morfofisiológica (ALBERTIN *et al.*, 2016; LOPANDIC *et al.*, 2008).

A análise da sequência foi baseada nas buscas e comparações com as mesmas cepas depositadas em bancos de dados, como Genbank, Mycobank, Ribosomal Database Project

(RPD), para o estudo filogenético. As seqüências de interesse obtidas e as de cepas de referência (tipo cepa) foram selecionadas e submetidas à análise filogenética, utilizando ferramentas de bioinformáticas, como os programas MEGA e Geneious. O alinhamento das sequências em pares e o cálculo das distâncias genéticas entre elas foram utilizados para construir a árvore filogenética com base no trabalho de Martins *et al.* (2014).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras nativas, por seqüenciamento genético, da fermentação espontânea da polpa de manga (*Mangifera indica* L. var Bacuri) para aplicação futura, como a produção de aguardente a partir da polpa de manga.

2. Material e Métodos

2.1 Isolamento, selecção e caracterização de leveduras

Todas as leveduras isoladas estavam presentes na fermentação espontânea da polpa de manga (*Mangifera indica* L. var Bacuri). O fruto da manga foi coletado na cidade de Belém - PA no pomar do campus experimental da EMBRAPA - Amazônia Oriental nas coordenadas X: 01°14,4S - Y:48°26'35"W. Os frutos com estágio avançado de maturação foram selecionados por suas propriedades sensoriais de cor, textura e aromada casca.

O procedimento de desinfecção dos frutos maduros utilizou álcool 70% (v/v) durante 10 minutos e, posteriormente, com hipoclorito de sódio 2% (v/v) durante 30 minutos. Após o procedimento asséptico, os frutos, manualmente polidos e esmagados, foram utilizados para a análise da microbiota, também para a fermentação natural. A preparação do mosto (caldo) apresenta a proporção de (1:2) polpa/água esmerilada, mantida à temperatura de 28°C por 7 dias. A cada 24 h, alíquotas de 1 mL foram retiradas e diluídas em 4,5 mL de uma solução estéril de cloreto de sódio (9 g.L⁻¹).

A diluição em série começou com a remoção de uma alíquota de 1 mL da primeira diluição, sob agitação constante, e transferida para um novo tubo com 4,5 mL de solução de cloreto de sódio, repetindo o procedimento até chegar a 10⁻⁷, segundo Ferreira *et al.* (2010). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas por estrias em uma placa contendo meio GPYA (20 g.L de ⁻¹glicose, 5 g.L de ⁻¹peptona, extrato de levedura, 20 g.L de ⁻¹água e 0,1 g de cloranfenicol) e incubadas em um D.B.O a 30°C por 3 dias.

A caracterização fenotípica foi realizada após três dias de plantio, seguida da descrição de características macroscópicas, como elevação, aparência, cor, forma e superfície da colônia, segundo Kurtzman e Fell (1998).

2.2 Identificação Molecular de Leveduras

2.2.1 Extração de DNA de leveduras

A extração do DNA foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). As colônias únicas derivadas de células foram dispersas como uma suspensão coloidal em 300µL de solução TE (10mL Tris-Cl pH 8,0 - 1M; 2mL EDTA pH 8,0 - 0,5M), 615µL tampão de lise/ tampão homogeneizador/solução de proteinase-K foi adicionado e incubado em um banho de água a 56°C durante 24h. Foi adicionado 600µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 - pH 7,5-8,0), a solução foi suavemente misturada durante 10 minutos e centrifugada a 13.000 rpm durante 10 minutos. A camada superior foi transferida para um tubo cônico de polietileno de 2mL, adicionou-se 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e depois misturou-se suavemente durante 10 minutos e centrifugou-se às 13.000 rpm durante 10 minutos. A camada superior foi transferida para um tubo cônico de 2mL de polietileno, 100µL de acetato de sódio gelado (3M, pH 4,8), e 500µL de isopropanol foram adicionados. A mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido, 500 µL de etanol foi adicionado, centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido, 80-100 µL de tampão TE foi adicionado e o material extraído foi armazenado em um freezer. A concentração de DNA foi inferida em Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Cerca de 100ng de DNA foi obtido para amostras.

2.2.2 Amplificação de DNA por código de barras

Para identificação molecular de leveduras, foi realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para amplificação do código de barras universal ITS usando os primers ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE *et al.*, 1990). O ensaio foi realizado em um volume final de 25,0 µL contendo 1,0 M de solução Q[®] (Quiagen, Hilden, Alemanha), 4,0 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP (deoxinucleotídeo trifosfato), 1,0 mM de cada primer (ITS1/ITS4), 1U de Taq DNA polimerase Platinum[®] (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) e 100ng de DNA. A reação cíclica foi realizada em MG-96G MyGene[™] Gradient Thermal Cycler (Long Gene, Hangzhou, China).

As condições de amplificação foram seguidas pela temperatura inicial de desnaturação de 95°C durante 5 min, 35 ciclos a 94°C durante 1 min; recozimento primário a 55,5°C

durante 2 min; e extensão a 72°C durante 2 min, e terminada com uma extensão final de 72°C durante 10 min (WHITE *et al.*, 1990). Para a visualização dos amplicons resultantes, o produto PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose.

A eletroforese foi realizada em um gel de agarose a 1,5% preparado com tampão Tris-Boric-EDTA (0,5 M, pH 8,0). Cinco microlitros de SYBR Safe foram adicionados à solução de fusão do gel de agarose como o composto fluorescente revelador. A eletroforese foi realizada a 600 mA e 120 V por 45 minutos. As bandas obtidas foram visualizadas em um transiluminador (UvP Bioimaging Systems Epichemi Darkroom). As amostras positivas foram reavaliadas por PCR e purificadas usando o kit de purificação PureLink PCR (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) para seqüenciamento.

2.2.3 Sequenciamento genético

O produto PCR purificado foi utilizado para sequenciação genética com os iniciadores ITS-1 e ITS-4. Reacções de amplificação foram realizadas usando BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As duas direcções foram sequenciadas para cada isolado. Os produtos de sequenciação de purificação foram realizados utilizando o BigDye XTerminator™ Kit de purificação (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A eletroforese capilar foi realizada no seqüenciador automático ABI3130XL Genetic Analyzer. A seqüência canónica gerada foi comparada com a base de dados do GenBank utilizando o programa BLAST para identificação molecular.

2.2.4 Reconstrução filogenética

Seqüências com alta similaridade ($\geq 98\%$) foram consideradas para basear a reconstrução filogenética e para obter um conjunto de dados. A árvore baseada em ITS foi obtida pelo método de Máxima Probabilidade (ML) aplicando 1.000 réplicas de bootstrap (HILLIS; BULL, 1993), com distância evolutiva calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) e distribuição gama (G). A reconstrução filogenética foi realizada em MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

2.3 Caracterização bioquímica

Para a caracterização bioquímica, foi utilizado o sistema comercial padronizado

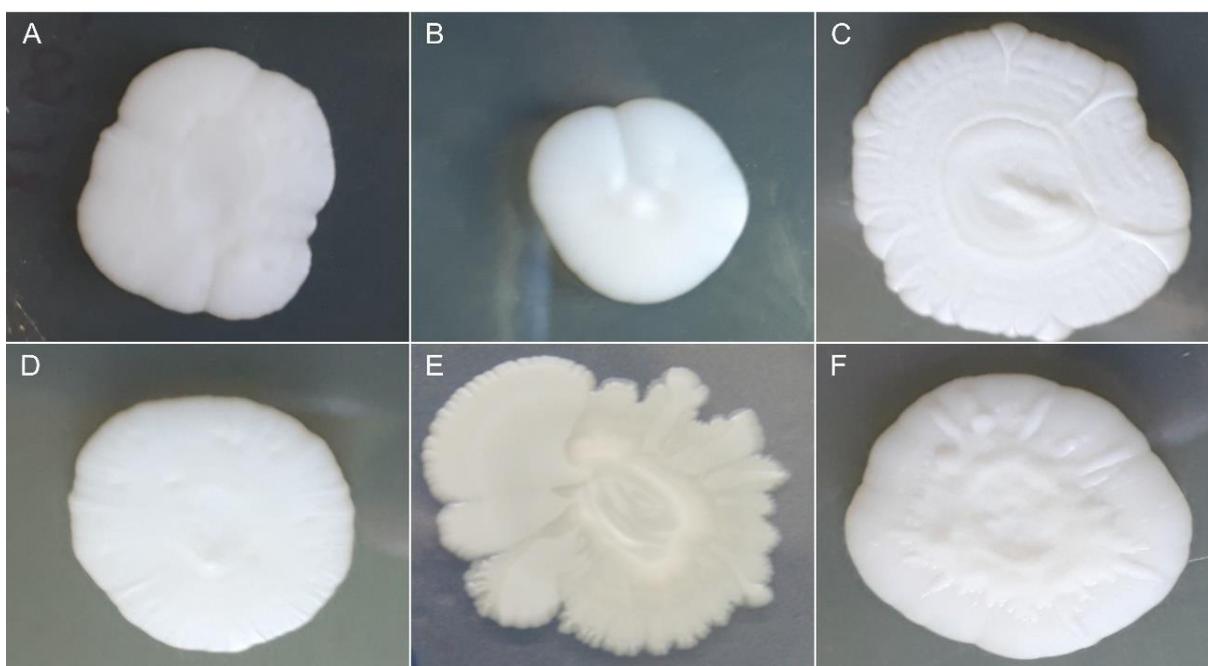
VITEK 2. Apenas um isolado de cada espécie de levedura foi selecionado para identificação pelo sistema VITEK 2. A suspensão de levedura foi preparada numa concentração entre 1,8 e 2,0 na escala McFarland (densitómetro -bioMérieux, França) utilizando uma solução salina a 0,45%. Em seguida, a suspensão fúngica foi inoculada nos cartões de identificação e os resultados foram lidos após 18 h de incubação, seguindo as instruções do fabricante (bioMérieux, França).

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento, selecção e caracterização de leveduras

Oitenta linhagens isoladas de leveduras foram obtidas a partir da fermentação natural da polpa de manga. Todas as colónias analisadas foram diferenciadas de acordo com suas características morfológicas macroscópicas e tipos representativos, resultando em leveduras isoladas com aspectos semelhantes. Foram observadas colónias brancas a marrons, com bordas regulares ou franjadas, textura cremosa e topografia lisa ou áspera (Figura 1). Todas elas apresentaram elevação convexa e crescimento satisfatório nos três dias de incubação.

Figura 1: Morfologia da colónia e características observadas a partir das leveduras recuperadas. A: MIBA 781; B: MIBA 782; C: 783; D: 784; E: 785; F: 786.



Tradicionalmente, as leveduras são caracterizadas, classificadas e identificadas através de características morfológicas e fisiológicas. Para a identificação específica, os estudos de

requisitos bioquímicos e nutricionais são mais relevantes que os traços morfológicos e sexuais, que são importantes na determinação do gênero (BIAŁKOWSKA *et al.*, 2017). A identificação dos isolados de leveduras e suas caracterizações são muito relevantes para a fermentação industrial, desde que a qualidade da bebida seja consequência da diversidade e composição dos microorganismos, assim como sua dinâmica e frequência de aparecimento (GUERRA *et al.*, 2001). Neste caso, as colônias isoladas e identificadas apresentam os códigos MIBA-781, MIBA-782, MIBA-783, MIBA-784, MIBA-785, e MIBA-786.

3.2 Identificação molecular por sequenciação de leveduras

A identificação molecular foi baseada na região ITS do código de barras de DNA e demonstrou que todos os 80 isolados investigados pertenciam à classe *Saccharomycetes*, Phylum *Ascomycota*. Foram identificadas linhagens representativas de quatro espécies diferentes: *Saccharomyces cerevisiae* com 53 isolados; *Hanseniaspora opuntiae* (n=12); *Candida haemulonis* (n=5); *Meyerozyma guilliermondii* (n=10), com semelhança de 98% a 100% com as sequências depositadas no GenBank (Tabela 1). Esta confirmação pode ser ressaltada por identificações anteriores que descreveram que 2% é uma margem aceitável para divergências intra-específicas em *Ascomycota* nas sequências da região STI (NILSSON *et al.*, 2008).

Tabela 1. Identificação da levedura no GenBank

Isolado	Semelhança (%)	Similaridade - deformação	GenBank (nome da espécie)
MIBA780	100	703/703 (100%) -	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIBA781	99	727/728 (99%) -	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIBA782	100	630/630 (100%) -	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIBA783	99	616/617 (99%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MIBA784	100	392/392 (100%)	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
MIBA785	100	372/372 (100%)	<i>Candida haemulonis</i>
MIBA786	100	577/577 (100%)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>

Existem alguns estudos sobre a microbiota da manga, mas existem apenas duas publicações com microorganismos isolados da polpa da manga; a primeira foi que os microorganismos foram isolados da fermentação do suco de manga de duas variedades diferentes, utilizando análises morfológicas e fisiológicas (SURESH; ONKARAYYA;

ETHIRAJ, 1982), e a segunda foi que os microorganismos de diferentes gêneros foram encontrados em duas variedades do fruto, tais como, os gêneros *Metschnikowia*, *Pichia*, e leveduras não-poros dos gêneros *Kloeckera*, *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, e *Aureobasidium*. Apesar de terem sido isolados da fermentação do suco, nenhum microorganismo do gênero *Saccharomyces* foi isolado, mas foram analisadas a região do gene 18S para duas variedades de manga (variedades Tommy e Haden), com base no sequenciamento e reconstrução filogenética e, se recuperou o microorganismo *Kluyveromyces marxianus* (BUENROSTRO-FIGUEROA *et al.*, 2018).

A qualidade da aguardente é altamente relacionada à ecologia microbiana e suas populações durante o processo de fermentação, esses fatores são determinantes para o rendimento do etanol e a produção de compostos secundários (GOMES *et al.*, 2009). Deste modo, os microorganismos naturais, especialmente as leveduras, devem apresentar potencialidades específicas em seu substrato natural. Portanto a busca pela caracterização da flora microbiana permitirá maior controle e confiabilidade no processo de fermentação (BAGHERI; BAUER; SETATI, 2017). Sabe-se que o uso de leveduras selecionadas, na maioria dos casos, aumenta a produtividade e melhora a qualidade do produto, especialmente os níveis de acidez e concentração de álcoois mais elevados (PATARO *et al.*, 2000). Vicente *et al.* (2007), também observaram que a utilização de inóculos, com cepas de leveduras selecionadas, pode aumentar a produtividade e o rendimento da fermentação, bem como a produção de ésteres e álcoois superiores, que são responsáveis pelo aroma da bebida. Além dessas propriedades, e de seu potencial de floculação, as linhagens selecionadas apresentam maior resistência às condições de estresse fermentativo, como altas concentrações de sacarose e etanol, e alta temperatura de operação (ARAÚJO *et al.*, 2006).

As cepas de *S. cerevisiae*, isoladas da fermentação da cana de açúcar, utilizando a técnica RAPD-PCR, demonstraram diferenças entre os isolados. Essas diferenças podem estar associadas à existência de muitos genótipos individuais entre as espécies e provavelmente resultaram de mutações pontuais ou pequenas deleções (GUERRA *et al.*, 2001).

Para melhorar a observação, a Figura 2 mostra a classe *Saccharomycetes* que se isola na disposição da árvore filogenética. As distâncias genéticas entre as linhagens foram representadas pela construção de um dendrograma agrupado pela máxima probabilidade, representando as relações dos isolados com seus parentes filogenéticos mais próximos. A classificação ótima das leveduras deve ser baseada na filogenia dos microorganismos, pois a relação classificação-filogenia, permite prever as semelhanças genéticas entre

algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares, é estimada usando a abordagem de Máxima Probabilidade Composta (MCL) e então seleciona a topologia com valor superior de probabilidade logarítmica. Uma distribuição Gama discreta usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre locais (5 categorias (+G, parâmetro = 6.1462)). A árvore desenhada à escala com comprimentos de ramos medidos no número de substituições por local é o foco. A análise envolveu 28 seqüências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1^a+2^a+3^a+Noncodificação. Não existem posições contendo lacunas e dados em falta. Houve um total de 310 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas tiveram lugar no MEGA7. Embora as cepas MIBA 780, MIBA 781, MIBA 782 e MIBA 783 tenham sido isoladas da polpa de manga, elas apresentam diferenças nas suas seqüências. Estas variações genéticas sugerem a presença de mais distinções entre o genoma da levedura e podem contribuir para a variedade de características organolépticas do produto fermentado.

3.3 Caracterização bioquímica

As cepas de levedura, recuperadas da manga apresentam caracterização bioquímica essencial para o controle de qualidade do produto final e processo de fermentação, e a metodologia aplicada deve relatar características que as descrevem como tendo a capacidade de assimilar os substratos disponíveis. Testes desta natureza foram aplicados às linhagens isoladas e são descritos na Tabela 2, com os seus perfis de assimilação de carbono, com base nos substratos presentes no cartão de identificação VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França).

É de salientar que, das 4 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, duas apresentaram pequenas diferenças quanto à assimilação de 2 compostos; para MIBA 780 e 781 não houve assimilação de n-acetilglucosamina, mas houve a assimilação de 2-keto-D-gluconato por MIBA 781.

Com base na análise VITEK 2, a base de dados do sistema identificou o microorganismo como *Saccharomyces cerevisiae* com 93% de probabilidade para MIBA 780, 782, 783 e baixa confiabilidade para MIBA 781. O MIBA 785 foi identificado como *Candida haemolunis* com 92% de probabilidade, de acordo com os achados de identificação molecular realizados no presente trabalho. Para Fernández-Espinar *et al.* (2001), as cepas de *S. cerevisiae* diferem significativamente em seu desempenho fermentativo e em sua contribuição para o aroma e qualidade final da bebida, entretanto, a maioria dessas cepas pertence à espécie

S. cerevisiae, o que limita o uso de métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos clássicos para sua distinção. Assim, para a melhoria do processo industrial de produção de aguardente, o conhecimento da bioquímica e fisiologia dos microrganismos envolvidos é fundamental. Portanto, o sistema VITEK 2 mostrou-se eficiente na identificação de alguns microrganismos, embora Hamoudi *et al.* (1984) tenham concluído em seus estudos que este sistema deve ser usado com cautela na identificação de microrganismos, devido à sua base de dados ser restrita.

Tabela 2. Perfil bioquímico da levedura de polpa de manga recuperada, avaliada pelo sistema automático VITEK 2.

Ensaio de detecção dos substratos	MIBA 780	MIBA 781	MIBA 782	MIBA 783	MIBA 784	MIBA 785	MIBA 786
Substratos específicos	Linhagens de leveduras						
L-Lisina ARILAMIDASE	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação L-MALATE	-	-	-	-	+	-	-
Leucina -ARILAMIDASE	+	+	+	+	+	+	+
ARGININA	-	-	-	-	+	+	+
Assimilação do Erythritol	-	-	-	-	-	-	+
Assimilação GLICEROL	-	-	-	-	+	-	+
Tirosina ARILAMIDASE	-	-	-	-	-	+	-
β -N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de ARBUTIM	-	-	-	-	+	-	-
AMYGDALIN Assimilação	-	-	-	-	-	-	-
D-GALACTOSE Assimilação	+	+	+	+	+	-	-
GENTIOBIOSE Assimilação	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação D-GLUCOSE	+	+	+	+	+	+	+
Assimilação do LACTOSE	-	-	-	-	-	-	-
Metilo α -D-glucopiranosídeo	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação							
D-CELLOBIOSE Assimilação	-	-	-	-	+	-	-
γ -glutamyltransferase	-	-	-	-	-	-	+
D-MALTOSE Assimilação	-	-	-	-	+	+	-
D-RAFFINOSE Assimilação	+	+	+	+	+	-	-
PNP-N-acetil-BD-galactosaminidase 1	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação D-MANOSE	+	+	+	+	+	+	-
D-MELIBIOSE Assimilação	-	-	-	-	-	-	-
D-MELEZITOSE Assimilação	-	-	-	-	+	-	-

L-SORBOSE Assimilação	-	-	-	-	+	-	-
L-RAMNOSE Assimilação	-	-	-	-	-	+	-
Assimilação do XYLITOL	+	+	+	+	+	-	-
Assimilação D-SORBITOL	-	-	-	-	+	+	-
SUCROSE Assimilação	+	+	+	+	+	+	-
UREASE	-	-	-	-	+	+	+
ALFA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-	+	-	-
D-TURANOSE Assimilação	+	+	+	+	+	+	-
D-TREALOSE Assimilação	+	+	+	+	+	+	-
Assimilação NITRATA	-	-	-	-	-	+	-
L-ARABINOSE Assimilação	-	-	-	-	-	-	-
D-GALACTURONATO Assimilação	-	-	-	-	+	+	+
AESCULIN Hidrólise	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação do L-GLUTAMATE	-	-	-	-	+	+	+
D-XYLOSE Assimilação	-	-	-	-	+	-	-
Assimilação DL-LACTATE	-	-	-	-	-	-	+
Assimilação de ACETATO	+	+	+	+	+	+	+
Assimilação do CITRATO (SODIUM)	-	-	-	-	+	+	+
Assimilação do GLUCURONATO	-	-	-	-	+	+	+
Assimilação L-PROLINE	-	-	-	-	+	+	+
Assimilação do 2-keto-D- gluconato	-	+	-	-	+	+	-
Assimilação da N- acetilglucosamina	-	-	+	+	+	-	+
Assimilação do D-GLUCONATE	-	-	-	-	+	+	+

(+): positivo; (-): negativo; Assimilação do substrato

4. Conclusões

A microbiota extraída da polpa do fruto da manga bacuri, durante a fermentação espontânea provou sua disponibilidade microbiana de cepas de leveduras capazes de assimilar açúcares na fermentação, especificamente, cepas da espécie *S. cerevisiae*. O perfil bioquímico evidenciou as diferentes características de assimilação destas cepas isoladas, que podem influenciar a produção de fermentados alcoólico da manga, bem como as suas propriedades organolépticas. Este trabalho apresenta um conjunto de leveduras, que foram devidamente isoladas e identificadas com potencial biotecnológico em um processo de fermentação, e que podem contribuir para os futuros processos de fermentação de *M. indica* var. bacuri ou outros frutos gerando produtos nobres.

5. Referências Bibliográficas

ALBERTIN, Warren *et al.* Hanseniaspora uvarum de Winemaking Environments Show Spatial and Temporal Genetic Clustering. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2016. DOI:10.3389/fmicb.2015.01569.

ARAÚJO V. de M.; FIETTO, L. G.; CASTRO, I. de M.; SANTOS, A. N. G. dos; COUTRIM, M. X.; BRANDÃO, R. L. Isolamento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e produzindo níveis mais elevados de composto aromáticos para a produção de ‘cachaça’ a aguardente de cana brasileira. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 51-59, 2006. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.018.

BAGHERI, B.; BAUER, F. F.; SETATI, Mathabatha E. The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI:10.3389/fmicb.2017.01988.

BIAŁKOWSKA, A. M.; SZULCZEWSKA, K. M.; KRYSIAK, J.; FLORCZAK, T.; GROMEK, E.; KASSASSIR, H.; KUR, Józef; TURKIEWICZ, Marianna. Caracterização genética e bioquímica de leveduras isoladas de amostras de solo antártico. **Polar Biology**, v. 40, n. 9, p. 1787-1803, 2017. DOI:10.1007/s00300-017-2102-7.

BUENROSTRO-FIGUERO A. J.; TAFOLLA-ARELLANO, J. C.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; RODRÍGUEZ-HERRERERA, R.; DELAGARZA-TOLEDO, H.; AGUILAR, C. N. Leveduras nativas para utilização alternativa de polpa de manga sobre amadurecida para produção de etanol. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 2, 2018. DOI:10.1016/j.ram.2016.04.010.

CRUZ, A. F.; BARKA, G. D.; BLUM, L. E. B.; TANAKA, T.; ONO, N.; KANAYA, S.; REINEKE, A. Avaliação de comunidades microbianas em cascas de frutas tropicais

brasileiras através da análise da seqüência amplicon. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n.3, p. 739-748, 2019. DOI: 10.1007/s42770-019-00088-0.

FOSTER, T.; VASAVADA, P. C. **Qualidade e segurança das bebidas**. London, CRC Press, 2003. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=asDLBQAAQBAJ>. Acesso em: 17/10/2021.

GAROFALO, C.; BERBEGAL, C.; GRIECO, F.; TUFARIELLO, M.; SPANO, G.; CAPOZZI, V. Seleção de cepas de leveduras indígenas para a produção de vinhos espumantes a partir de castas autóctones da Apúlia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, 2018. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.004.

GUERRA, J. B.; ARAUJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Diversidade genética das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante o ciclo fermentativo de 24 h para a produção da cachaça artesanal brasileira. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, 2001. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2001.00959.x.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n. 2, p.182-192, 1993. DOI:10.1093/sysbio/42.2.182.

KHOO, P.; CABRERA-AGUAS, M. P.; NGUYEN, V.; LAHRA, M. M.; WATSON, Stephanie L. Microbial keratitis in Sydney, Austrália: fatores de risco, resultados dos pacientes e variação sazonal. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 258, n. 8, p.1745-1755, 2020. DOI:10.1007/s00417-020-04681-0.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. DOI: 10.1093/molbev/msw054. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msw054>. Acesso em: 17/10/2021.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **As leveduras: um estudo taxonômico**. 4. ed. Amsterdam, Elsevier, 1998. 1055 p. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/the-yeasts/kurtzman/978-0-444-52149-1>. Acesso em: 17/10/2021.

LISZKOWSKA, W.; BERLOWSKA, J. Fermentação por levedura a baixas temperaturas: Adaptação às condições ambientais em mudança e formação de compostos voláteis. **Moléculas**, v. 26, n. 4, 2021. DOI:10.3390/molecules26041035.

LOPANDIC, K. *et al.* Perfil molecular de leveduras isoladas durante fermentações espontâneas de vinhos austríacos. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1063-1075, 2008. DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00385.x.

LUZÓN-QUINTANA, L. M.; CASTRO, R.; DURÁN-GUERRERO, E. Processos Biotecnológicos na Produção de Vinagre de Frutas. **Alimentos**, v. 10, n. 5, 2021. DOI: 10.3390/foods10050945.

MALDONADO-CELIS, M. E.; YAHIA, E. M.; BEDOYA, R.; LANDÁZURI, P.; LOANGO, N.; AGUILLÓN, J.; RESTREPO, B.; GUERRERO OSPINA, J. C. Composição química da manga (*Mangifera indica* L.) fruta: compostos nutricionais e fitoquímicos. **Frontiers in Plant Science**, v.10, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.01073.

MELO, D. L. F. M. de; SANTOS, F. C.; BARBOSA JUNIOR, A. M.; SANTOS, P. O.; CARNELOSSI, M. A. G.; TRINDADE, R. de C. Identificação de leveduras isoladas da polpa natural e a produção de vinho "umbu" caseiro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, 2007. DOI:10.1590/S1516-89132007000500017.

NILSSON, R. Henrik; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, Martin; HALLENBERG, Nils; LARSSON, Karl-Henrik. Variabilidade intra-específica de *ITS* no Reino *Fungos* expressos nas bases de dados de Sequências internacionais e suas implicações para a identificação de espécies moleculares. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 4, 2008. DOI: 10.4137/EBO.S653.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Comunidades de leveduras e polimorfismo genético de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à fermentação artesanal no Brasil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, 2000. DOI:10.1046/j.1365-2672.2000.01092.x.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Efeito das condições de fermentação no crescimento de leveduras e composição volátil do vinho produzido a partir de suco de manga (*Mangifera indica* L.). **Food and Bioprocess Technology**, v. 89, n. 4, 2011. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.11.007.

OLIVEIRA, Érica R.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M.; OLIVEIRA, A. R.; DUARTE, C. M., Renata; VILAS BOAS, E. V. de B.; Avaliação da qualidade química e sensorial da bebida alcoólica fermentada de cana-de-açúcar. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, 2018. DOI: 10.1007/s13197-017-2792-4.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Clonagem molecular: um manual de laboratório**. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=LbXUAQAACAAJ>. Acesso em: 17/10/2021.

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E.; NICOLINO, M. P.; VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, 2014. DOI:10.1111/1574-6976.12073.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA JÚNIOR, J. J. da. RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiologia e fisiologia das fermentações da Cachaça (Aguardente). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 1, 2001. DOI: 10.1023/A:1010225117654.

SURESH, E. R.; ONKARAYYA, H.; ETHIRAJ, S. Uma nota sobre a flora de leveduras associada à fermentação da manga. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, n. 1, 1982. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1982.tb04365.x.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C. *et al.* Transcriptome analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit epidermal peel to identify putative cuticle-associated genes. **Relatórios Científicos**, v. 7,

n. 1, 2017. DOI:10.1038/srep46163.

WHITE, T. J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplificação e sequenciamento directo de genes RNA ribossómicos fúngicos para protocolos phylogenetics PCR: a guide to methods and applications** (Guia de Métodos eAplicações), 1990. DOI:citeulike-article-id:671166.

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de Método Analítico, por Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio e Calibração Multivariada, para Quantificação do Teor de Etanol obtido na Fermentação da Polpa de Manga (*mangifera indica* L.) Variedade bacuri

PUBLICADO COMO CAPITULO DE LIVRO:

GOBIRA, R. M. ; COSTA, P. S. S. ; MELLO, R. F. A. ; SILVA, G. C. T. ; MOREIRA, S. G. C. ; JUNIOR, P. A. A. ; SANTOS, A. S. . DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO, POR ESPECTROSCOPIA NA MIDINFRADA, E CALIBRAÇÃO MULTIVARIAL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL NA PASTA DE MANGA FERMENTADA (*Mangífera indica* L.) VARIEDADE BACURI. Em.: "Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos". Cap. 17, p. 133 - 137; Editora Atena; Ponta Grossa-PR, 2018 ISBN 978-85-85107-47-5

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos fiáveis para o controlo e monitorização da qualidade do produto final é uma exigência do mercado consumidor e dos organismos de inspecção e regularização, é essencial para a indústria que sejam também convenientes do ponto de vista técnico e de custo. É simples e rápido de aplicar, reduzindo consideravelmente fases de produção e perdas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método para a determinação do teor de etanol e outros subprodutos, tais como aldeídos, ésteres e ácidos, de forma verde, rápida e barata, em fração destilada de estercó fermentado de polpa, utilizando espectroscopia na região do médium infravermelho e calibração multivariada.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação. Quantificação de Etanol. Infravermelho.

ABSTRACT

The development of reliable analytical methods for controlling and monitoring the quality of the final product is a requirement of the consumer market and inspection and regularization bodies, it is essential for the industry that they are also convenient from a technical and cost point of view. It is simple and quick to apply, reducing considerably production phases and losses. The objective of this work was the development of a method for the determination of ethanol content and other by-products, such as aldehydes, esters and acids, in a green, fast and inexpensive way, in distilled fraction of fermented slurry manure, using spectroscopy in the infrared medium region and multivariate calibration.

KEY WORDS: Fermentation. Ethanol Quantification. Infrared.

1.INTRODUÇÃO

A produção de álcool a partir da fermentação de matérias-primas ricas em carboidratos é uma das vias mais importantes para obter bebidas alcoólicas e produtos alcoólicos de alto valor acrescentado (álcool anidro, álcool aromatizado, aguardente, etc.). Importante setor da indústria do álcool. As técnicas analíticas modernas incorporam uma série de metodologias, sendo as baseadas na cromatografia gasosa (CG) as mais utilizadas pela indústria e reguladores no controle de qualidade destes produtos. No entanto, é demorado e requer um pré- tratamento da amostra para poder ser aplicado com bons resultados. A espectroscopia infravermelha tem sido frequentemente aplicada como um método analítico que fornece resultados suficientes na determinação dos aspectos funcionais das moléculas orgânicas e dos parâmetros qualitativos dos produtos agrícolas e alimentares. Aplicações recentes têm sido feitas nas indústrias de óleo, têxtil, carvão, cosmética, polímeros, química, tintas, farmacêutica, sendo também aplicadas na restauração de imagens decorativas de pinturas históricas. Métodos baseados na MID são ambientalmente limpos porque não requerem o uso de solventes, não geram resíduos químicos, podem não requerer qualquer pré-tratamento da amostra, no entanto, o seu uso deve ser acompanhado pela aplicação de métodos

quimiométricos que permitam a resolução de problemas de selectividade Interferência sem comprometer a precisão e precisão. O desenvolvimento destes métodos requer um modelo de calibração robusto que incorpora todas as possibilidades de fontes de variação, melhorando assim o controle de qualidade dos produtos. (FERREIRA, BRAGA e SENA, 2013).

2. METODOLOGIAS

2.1 A coleta do material

O material botânico, manga (*Mangifera indica* L.) variedade Bacuri foram coletados em Belém - PA no campus experimental EMBRAPA - Amazônia Oriental, nas coordenadas X: 01°14,42S - Y: 48°26'35 "O, Sendo escolhida pela sanidade e ausência de lesões.

2.2 Processamento, polpação e caracterização da polpa e do material fermentado

Os frutos foram cozidos e higienizados por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 15 minutos, enxaguados em água destilada. As cascas e sementes foram retiradas manualmente, a polpa foi cortada em cubos e moída no liquidificador, armazenada em sacos plásticos de polietileno (2L) e resfriada a - 20 C até a realização das análises e preparação do mosto para fermentação. Para a caracterização, foram realizadas as seguintes análises: Acidez Total Titrável (ATT) e Sólidos Solúveis Totais (SST) de acordo com IAL (2008); Açúcares Redutores Totais (TRS) de acordo com Miller (1959) e Hidrogênio Potencial-PH AOAC (2007)

2.3 Preparação da polpa de manga para a fermentação

Uma mistura de polpa e água (1:1) tinha adicionado sacarose até que os sólidos solúveis totais (SST) fossem ajustados a 15 °Brix, e esterilizados a 121 °C (1Kgf/cm²) durante 15 minutos.

2.4 Fermentação

A fermentação foi realizada utilizando um sistema semi-fechado e estático, num tambor de polipropileno de 5L equipado com um mecanismo para promover a libertação de CO₂. Para o processo de fermentação, foram adicionados 9 g/L de células secas de *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação ocorreu a 30 °C durante 15 horas, de acordo com a metodologia descrita em Alvarenga *et. al.* (2013).

2.5 Destilação

O material fermentado foi filtrado em um tecido de algodão e a destilação foi processada em uma coluna de vidro de destilação fracionada de 1,20 m de altura. O vapor destilado funcionou a 93 a 98° C durante 120 minutos.

2.6 Quantificação de etanol por Espectroscopia de Infravermelho Médio

A concentração de etanol foi determinada a partir da relação linear entre concentração e absorvância (Lei Lambert-Beer) dos espectros registrados na região do infravermelho médio. Para a construção da curva analítica, foram preparadas soluções padrão de etanol nas concentrações percentuais de etanol (V/V) de 10, 50, 90 e 100%. Os espectros dos padrões e amostras foram registrados em um espectrômetro da marca BRUKER, transformada de Fourier modelo vértice 70v (FT-IR) e acessório de reflexão total atenuada (ATR) a 23 C °, com 32 varreduras na faixa espectral 4000-400 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

2.6.1 Tratamento dos dados espectrais e quantificação da construção do modelo por mínimos quadrados parciais (PLS)

Para o cálculo e construção dos modelos de calibração multivariada (PLS) será utilizado o software Unscrambler 9.1.7. Quanto ao pré-processamento, a normalização vetorial e a centralização dos dados serão testadas separadamente, derivadas (primeira e segunda) para melhorar a resolução espectral. O ajuste, expresso pelo software coeficiente de determinação (R²) juntamente com o número de variáveis latentes (LVs), estes dois parâmetros são inversos, embora expressem o ajuste do modelo, quanto menor o número de LVs, melhor e mais ajustado é o modelo da moda; o erro quadrático médio quadrático médio (RMSEC), a previsão do erro quadrático médio quadrático médio (RMSEP) expressam a precisão do modelo.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

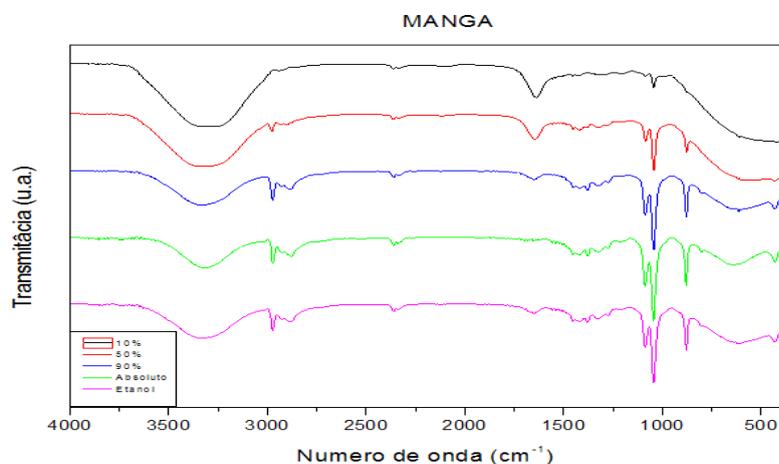
A Tabela 1 mostra os dados do perfil SST, SRP, acidez e pH. Analisando os resultados obtidos, verificou-se que ao final da fermentação houve uma diminuição na concentração do SFA e do STR, respectivamente 77% e 83%, causada pela ação do microorganismo. Verificou-se também que houve aumento sutil do pH e da acidez das amostras, o que mostra que não houve produção excessiva de ácido. Um alto índice de acidez confere ao produto um sabor desagradável de vinagre.

Tabela 1. Tabela de Caracterização

	Polpa	Fermentado	Destilado
Acidez Titrável (g / 100 mL)	0.31	0.33	-
Sólidos Solúveis Totais (SST) (°Brix)	13	3	-
Açúcares Redutores Totais (ART) (g / L)	6.58	1.17	-
pH	3.49	3.78	-
Etanol% (v / v)	-	-	91

A fermentação ocorreu de forma satisfatória, ao ponto de a levedura não poder fermentar os açúcares disponíveis devido à falta de nutrientes, e o excesso de álcool no meio. Após a filtração, foram obtidos 2800 mL de material fermentado e o etanol obtido na destilação atingiu um volume de 106 mL. A Figura 2 ilustra os espectros infravermelhos para as soluções padrão de etanol preparadas para a construção da curva analítica e da amostra. As faixas de destaque em 1150 e 1100 cm^{-1} respectivamente correspondem a estiramentos simétricos e assimétricos das conexões de acoplamento do CCV no etanol com absorvância proporcional à concentração. Será utilizado o método de seleção do número de ondas dos dados espectrais na faixa de 1120-1000 cm^{-1} para construir o modelo matemático para quantificar os mínimos quadrados parciais (PLS). A qualidade dos modelos construídos será avaliada de acordo com os parâmetros descritos na seção 2.7 e aplicada na determinação do teor alcoólico das amostras.

Figura 2: Espectros de infravermelho das soluções padrão e etanol obtido do mosto fermentado da manga por destilação.



4. CONCLUSÕES

A metodologia de obtenção do álcool é rápida e satisfatória quando aplicada à polpa da manga com leveduras comerciais (*Saccharomyces cerevisiae*), resultando em um produto final de alto teor alcoólico. A espectroscopia IR provou ser uma técnica precisa, que foi rápida e simplesmente aplicada para determinar o teor alcoólico do produto obtido pela destilação da manga fermentada da manga. Os dados espectrais registrados para soluções padrão e amostras serão utilizados na construção de modelos de quantificação multivariados para etanol e outros subprodutos produzidos pela fermentação e que seus níveis são indicativos de parâmetros de qualidade do produto final. Devido à simplicidade do processo, a fermentação alcoólica da manga é uma prática viável para os pequenos produtores, visando fabricar a manga e, conseqüentemente, proporcionar uma nova fonte de renda. A otimização do processo de fabricação está em desenvolvimento para a obtenção de um grau alcoólico satisfatório, a fim de classificar o produto como aguardente de frutas.

5.REFERÊNCIAS

ALVARENGA, L. M.; ALVARENGA. Avaliação do fermentado e dos compostos secundários em aguardente de banana e manga. **Alim. Nutrição**, Araraquara v. 24, n. 2, 2013, p. 195-201.

Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2007.

CARVALHO, C. R.; L. ROSSETO, C. J.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; CASTRO, J. V.; BORTOLETTO, N. Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo instituto agrônômico de campinas comparadas a outras de importância comercial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, 2004, p.264-271.

FERREIRA, M. H; BRAGA, J. W. B; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric for direct determination of hydrochlorothiazide in a pharmaceutical sample by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**. Vol 109, 2013, 158 – 164.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**: métodos químicos e físicos para alimentos. 4. ed. São Paulo. 2008.

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

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. F.; ABREU, F. A. P.; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2002, p. 309–322.

Conclusão Final

Ao final desse trabalho a manga mostrou ser um substrato de potencial altamente biotecnológico, por ser capaz de desenvolver em sua microbiota uma diversidade de leveduras com características e potencialidades diferentes. O conhecimento das características da diversidade de leveduras selecionadas bem como suas propriedades bioquímicas, tende a subsidiar processo futuro de produção de aguardente de manga utilizando microrganismo naturalmente ocorrentes de forma a favorecer a geração de um produto sustentável. Assim este estudo contribuiu para catalogar microrganismos locais isolados no estado do Pará e fornecer informações adicionais para apoiar futuras pesquisas sobre o potencial industrial desses microrganismos, e geração de produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Fernando Antonio Pinto de Abreu. **Aspectos tecnológicos da gaseificação do vinho de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

AKUBOR, P. I.; OBIO, S. O.; NWADOMERE, K. A.; OBIOMAH, E. Production and quality evaluation of banana wine. **Plants Foods for Human Nutrition**, Netherlands, v. 58, n. 5, p. 1-6, sept. 2003.

ALMEIDA, M. M. de; TAVARES, D. P. S. de; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.

ALVARENGA, Letícia Mendonça. **Efeito do tratamento enzimático da polpa na produção de aguardente de manga**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ALVARENGA, L. M. Avaliação do fermentado e dos compostos secundários em aguardente de banana e manga. **Alim. Nutrição**, Araraquara, v. 24, n. 2, p. 195-201, 2013

ALVARENGA, L. M.; MAIA, A. B. R. A.; OLIVEIRA, E. S. Processamento, avaliação química e sensorial de aguardente de manga (*Mangifera indica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20., 2006, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: SBCTA, 2006.

ALVARENGA, Raquel Mendonça. **Avaliação de parâmetros da fermentação e da destilação para adequação dos teores de compostos secundários em aguardente de**

banana. 2011. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ALVES, E. J. **A Cultura da banana**: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais, 2. ed. Brasília, EMBRAPA-SP, 1999. p. 585

ALVES, J. G. L. F.; TAVARES, L. S.; ANDRADE, C. J.; PEREIRA, G. das G.; DUARTE, F. C. Desenvolvimento, avaliação qualitativa, rendimento e custo de produção de aguardente de goiaba. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, p. 64-68, 2008.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo, Edgard Blucher, 2001. v. 4

ASSIS, O.; MOREIRA, Z. J. **Produção de bebidas fermentadas e não fermentadas de frutas**. Salvador: Senai Dendezeiros, 2013. Disponível em: <https://www.docsity.com/pt/producao-de-bebidas-fermentadas-e-nao-fermentadas-de-frutas/4837224/>, Acesso em: 14/10/2022.

ASQUIERI, E. R.; SILVA, A. G. M.; CÂNDIDO, M. A. Jabuticaba fruit aguardiente made from skin and sediments resulting from the production of fermented jabuticaba. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, v. 29, p. 896–04, 2009.

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI FILHO, F. Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 13., Águas de São Pedro. **Anais [...]**. Águas de São Pedro: COBEQ, 2000.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YONG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**, v. 26, n, 1, p. 89-105, 2008.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 2. ed. New York, Cambridge University, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997**: dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, DF, Presidência da República, 1997. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d2314.htm#:~:text=D2314&text=DECRETO%20No%202.314%2C%20DE%204%20DE%20SETEMBRO%20DE%201997.&text=Regulamenta%20a%20Lei%20n%C2%BA%208.918,que%20lhe%20confere%20o%20art.](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d2314.htm#:~:text=D2314&text=DECRETO%20No%202.314%2C%20DE%204%20DE%20SETEMBRO%20DE%201997.&text=Regulamenta%20a%20Lei%20n%C2%BA%208.918,que%20lhe%20confere%20o%20art.,), Acesso em: 14/10/2021.

CARDOSO, M. das G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 1 ed. Lavras, UFLA, 2001. p. 264

CARVALHO, C. R. L.; OSSETTO, C. J.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A., CASTRO, J. V. de.; BORTOLETTO, N. Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo instituto agrônomo de campinas comparadas a outras de importância

comercial. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 26, n. 2, p. 264-271, 8 ago. 2004.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. *In*: LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo, Edgar Blücher, 2001. p.p. 205-222. v. 2

CASIMIRO, A. R. S.; AGUIAR, L. M. B. A.; MEDEIROS, M. das C. **Vinho de Caju**. Fortaleza, Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial - NUTEC, 1989. p. 27. (Série implantação de Alimentos)

CERQUEIRA, D. P.; CRUZ, S. H.; FRANCISCO, N. L.; BRAZACA, S. G. C. Estudo da composição centesimal de bagaço de laranja visando a produção de etanol. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 16., 2008, Piracicaba. **Anais [...]**. Piracicaba: SIICUSP, 2008.

CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. C. Fermentados de jaboticaba (*Myrciaria Cauliflora* Berg): processos de produção, características físico-químicas e rendimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 277-282, 2005.

CINELLI, Pedro Alves. **Produção de Etanol a Partir da Fermentação Simultânea à Hidrólise do Amido Granular de Resíduo Agroindustrial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química). Universidade Federal de Rio de Janeiro, 2012.

CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Rendimento e composição das aguardentes de cana, laranja e uva com utilização de lecitina no processo fermentativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 577-584, 2004.

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

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração do fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.3, p. 342-350, 2003.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. dos S. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 319-329, mar, 2007.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA, J. B. de e S.; SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, dec. 2010.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; MELO, P. G. V. de; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabirola (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, apr. 2009. DOI: 10.1007/s10295-009-0526-y.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. *In*: Schmidell, W. (Coord.) LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgar Blücher, p. 205-222, 2001. v. 2

FAGUNDES, G. R.; YAMANISHI, O. K. Quantidade e preços da banana- 'prata' comercializada nas Ceasas do Distrito Federal, São Paulo, Belo Horizonte e Rio de Janeiro, no período de 1995 a 1999. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 593-596, dez. 2001.

FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MOURA, C. F. H.; OLIVEIRA, A. C.; ARAÚJO, N. C. C. Calidad de frutas nativas de latinoamerica para procesamiento: ciruela mexicana (*Spondiaspurpurea* L.). *In*: REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 45., 1999, Lima. **Anais [...]** Lima: ISHS, 1999. p. 52.

FILGUEIRAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E. Cirigüela (*Spondiaspurpurea* L.). *In*: DONADIO, L. C. (Ed.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal, Funep, 2000. p. 27.

FINGUERUT, J. I. Workshop Brasileiro sobre obtenção de etanol. **Projeto etanol**. Centro de Tecnologia Canavieira, 2006.

GARCÍA-LLOBODANIN, L.; FERRANDO, M.; GUELL, C.; LÓPEZ, F. Pear distillates: influence of the raw material used on final quality. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 228, n. 1, p. 75-82, nov. 2008.

IMPE VAN, J. F.; NICOLAY, B. M.; VANROLLEGHM, P. A.; SPRIET, J. A.; MOOR, B. D.; VANDEWALLE, J. Optimal control of the penicillin G. fed-batch fermentation: an analysis of the model of Heijnen et al. **Optimal Control Appl. e Methods**, v. 15, p. 13-34, 1994.

JANZANTTI, Natália Soares. **Compostos voláteis e qualidade de sabor da cachaça**. 2004. Tese (Doutorado Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KOHATSU, D. S.; EVANGELISTA, R. M.; LEONEL, S. Características de qualidade da casca, polpa e miolo de goiaba em diferentes estádios de maturação. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 2, n.4, p. 86-91, 2009.

LARA, Carla Alves. **Produção de aguardente de banana**: emprego de enzimas pectinolíticas e efeito de fontes de nitrogênio e quantidade de inóculo na formação de álcoois superiores. 2007. Dissertação (Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

LEE, P. R.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Effect of fusel oil addition on volatile compounds in papaya wine fermented with *Willio psissaturnus* var. *mrakii* NCYC2251. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, jun. 2010a

LEE, P. R. ONG, Y. L.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Evolution of volatile compounds in papaya wine fermented with three *Williopsis saturnus* yeasts. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 2032-2041, oct. 2010b.

McNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Fermentation: A Practical Approach**. 1 ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

MENEGUZZO, J.; MANFROI, L.; RIZZON, L. A. **Vinho, sistema de produção**. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, ago. 2006. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/index.htm>. Acesso em: 14/10/2022.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. de S.; HORII, J.; ALCARDE, André Ricardo. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 27, p. 897-901, 2007.

MOURA, C. F. H.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E. Pinha (*Annonasquamosa* L.). In: DONADIO, L. C. (Ed.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal, Funep, 2000a. p. 51.

MOURA, C. F. H.; ALVES R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C.; ALMEIDA, A. S. Quality of fruits native to Latin America for processing: mangaba (*Hancornia Speciosa* Gomes). In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL AND SUBTROPICAL FRUITS, 2000, Cairns. **Resumo** [...]. Cairns, Australia: International Society for Horticultural Science, p. 47. 2000b.

MOURA, C.F.H.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C.; ALMEIDA, A. S. Quality of fruits native to Latin America for processing: mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Acta Horticulture**, v. 575, p. 549-554, 2001.

MUNHOZ, C. L. *et al.* Produção e análise de aceitação de cachaça de mexerica por teste afetivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20., 2006, Curitiba. **Anais** [...]. Curitiba: SBCTA, 2006.

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. F.; ABREU, F. A. P.; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 309-322, 2002.

NARAIN, N.; Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* forma *Flavicarpa*) E DE CAJÁ (*Spondiasmombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 24, n. 2, p. 212-216, abr./jun. 2004.

NOGUEIRA, A. *et al.* Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 26, n. 2, p. 187-194, abr./jun. 2005.

OLIVEIRA, Evelyn de Souza. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. Tese (Doutorado Engenharia de Alimentos) -

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

OLIVEIRA, M. E. S.; PANTOJA, L. DUARTE; W. F.; COLLELA, C. F.; VALARELLI, L. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both/ free and immobilized yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, 2011.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEINNEC, I.; DAHHOU, B. Optimization and control of a fed-batch fermentation process. **Optimal Control Appl. & Methods.**, v. 15, p. 175–191, 1994.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. *In*: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed). **The Alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. Bath, Nottingham University Press, 2003.

SALVIANO, A. T. M.; AMARAL, C. R. S.; LUCENA, J. E.; MOREIRA, R. T.; NÓBREGA, I. C. C. Elaboração e aceitação sensorial de uma aguardente bi-destilada de Jaca (*Artocarpus Heterophilus* Lam). *In*: JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 2., 2007, João Pessoa. **Anais [...]**. João Pessoa: JNA, 2007. p.102-105.

SANDHU, D.K.; JOSHI, V. K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. **Indian Food Industry**, v. 14, n. 1, p. 24 - 34, 1995.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. *In*: FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. *In*: Schmidell, W. (Coord.) LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo, Edgar Blücher, p. 205-222, 2001. v. 2

SILVA JÚNIOR, Z. P. *et al.* Características físico-químicas da cachaça de abacaxi. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20., 2006, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: SBCTA, 2006.

SILVA, M. B. L. *et al.* Hidrólise enzimática da polpa e qualidade físico-química de aguardente de banana refugo. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004, Recife. **Anais [...]**. Recife: SBCTA, 2004.

SILVA, C. L. C.; VIANNA, C. R.; CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; GOMES, F. C. O.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Selection, growth, and chemo-sensory evaluation of flocculent starter culture strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the large-scale production of traditional brazilian cachaça. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 131, p. 203–210, 2009.

SIMÃO, L. O.; MAIA, A. B.; ALVES, J. G. Avaliação do tratamento enzimático com pectinase na produção de aguardente de manga. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., 2005. **Resumos [...]**. Recife: SINAFERM, 2005.

SOUFLEROS, E. H.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, G.; TSIMITAKIS, E. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine: sensory evaluation and optimization of its composition. **Food Chemistry**, London, v. 75, n. 4, p. 487-500, dec. 2001.

TORNAL-LEHOCZKI, J.; PÉTER, G.; DLAUCHY, D. CHRO Magar Candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. Inter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 189-200, 2003.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, E. da; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H da. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 489-492, 2006.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo; Editora Blucher, 2010.