



# Processo fermentativo para PRODUÇÃO DE BEBIDA

Processo Fermentativo para Produção de Bebida Alcoólica de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)

## Resumo

A viabilidade técnica de produzir de bebida alcoólica a partir de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), fruto amiláceo da Região Amazônica, foi investigada por fermentação semi-sólida. A polpa do fruto foi caracterizada quimicamente, sendo exibido alto conteúdo amiláceo (44,3%, em base úmida). Após a hidrólise enzimática prévia do amido, com  $\alpha$ -amilase e glucoamilase comerciais, o meio foi inoculado com células de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação) e o processo fermentativo monitorado em intervalos de 24 horas, para acompanhar a viabilidade celular, o consumo de substrato, a produção de etanol, a acidez total e o teor de carotenóides totais. O alto rendimento em polpa amilácea (71,2%), as elevadas conversões de hidrólise (90%) e eficiência de fermentação (93,5%), assim como a boa aceitabilidade do produto (80%), sugerem a aplicação da pupunha na produção de bebida alcoólica fermentada, gerando oportunidades para novos desenvolvimentos econômicos na região amazônica.

**Palavras chave:** pupunha, composição química,  $\alpha$ -amilase, glucoamilase, fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, análise sensorial.

## Introdução

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira domesticada pelos ameríndios desde épocas pré-colombianas. Seu cultivo é feito em toda a Amazônia e constitui-se em valiosa planta de subsistência (Figura 1). Tem ampla distribuição, sendo encontrada por toda a Amazônia e América Central a partir de Honduras (Figura 2). Seus frutos têm grande potencial econômico devido à sua composição química, produtividade agrícola (13.500 ton/ano) e

amplo consumo regional (Clement, 2000). A pupunha é um fruto rico em minerais e pró-vitamina A e, dependendo da raça, em carboidratos ou lipídios (Arkoll & Aguiar, 1984).

A partir da pupunha é preparada a caçuma, bebida consumida pelos índios em datas comemorativas. É feita artesanalmente de diferentes modos, de acordo com a etnia. Algumas tribos mastigam a pupunha e a deixam fermentar, geralmente por até sete dias, e, dessa forma, a ptialina contida na saliva



**Figura 1.** Pupunheira amazônica  
Foto: C. R. Clement

é incorporada à massa, e hidrolisa o amido, conseqüentemente.

Apesar do enorme potencial da pupunha na Região para a produção e comercialização de bebidas, esse aspecto tem sido pouco explorado, pois a maioria dos produtos oriundos daquele fruto é processada de forma artesanal. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver a tecnologia para produzir uma bebida alcoólica, por processo

### Lílian Pantoja de Oliveira

Bióloga, MSc – Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós-colheita/CPTA/INPA

### Roberto Maeda

Engenheiro Agrônomo – Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós-colheita/CPTA/INPA

### Jerusa de Souza Andrade

Engenheira Agrônoma, DSc – Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós-colheita/CPTA/INPA

### Nei Pereira Junior

nei@eq.ufjf.br  
Engenheiro Químico, PhD – Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Bioquímica da EQ/UFRJ

### Sônia Maria da Silva Carvalho

Farmacêutica, MSc – Laboratório de Micologia do Departamento de Parasitologia do ICB/UA.

### Spartaco Astolfi Filho

sastolfi@ua.com.br  
Biólogo, DSc – Laboratório de Genética do Centro de Apoio Multidisciplinar do ICB/UA.

Fotos cedidas pelos autores



**Figura 2.** Distribuição geográfica da pupunheira

fermentativo, utilizando-se a pupunha como matéria-prima.

### **Materiais e Métodos** **Matéria-prima e caracterização**

Foram utilizados frutos da pupunheira no estágio maduro, pertencentes à raça Solimões, colhidos em safra secundária e adquiridos no mercado Adolpho Lisboa, em Manaus. Os cachos foram pesados e, após a despenca, os frutos foram selecionados quanto à sanidade e à maturação, avaliados em relação ao número, peso, diâmetro longitudinal e transversal e peso do descarte (semente e casca) e lavados em água corrente.

Os frutos foram, então, submetidos à cocção por 5 minutos em tacho de aço inoxidável com capacidade para 100 litros, aquecido a vapor, com agitação mecânica. Após a drenagem da água e o



**Figura 3.** Pré-tratamento da matéria prima

resfriamento, foram acondicionados em sacos plásticos de alta densidade e estocados a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para a caracterização centesimal e o preparo do meio de fermentação, os frutos foram descongelados e após descascamento e retirada de semente, a polpa foi caracterizada (em triplicata), quanto às proteínas solúveis, pelo método de Biureto (Harris & Angal, 1994) e carotenóides totais, por espectrofotometria (Higby, 1962). Os lipídios (extração com éter de petróleo em Soxhlet), fibra total (tratamento ácido-básico), umidade ( $65^{\circ}\text{C}$ ) e cinzas (incineração em mufla a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) seguiram metodologias descritas pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). O amido foi extraído e hidrolisado segundo Ranganna (1996) e a glicose liberada, quantificada pelo método de Somogyi-Nelson (Southgate, 1976).

### **Enzimas e Microrganismo**

A hidrólise do amido presente na pupunha foi realizada com as enzimas comerciais  $\alpha$ -amilase e glucoamilase (NOVO Nordisk S/A) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento seco Fleischmann) foi empregada como agente do processo fermentativo.

### **Preparo do Meio de Fermentação**

Analogamente à caracterização da matéria-prima, a massa de fermentação foi preparada pelo descongelamento dos frutos, seguido de cocção por 2,5 horas, resfriamento, despolpa, trituração e esterilização em autoclave por 15 minutos, a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para otimização das condições de hidrólise, foram realizados testes preliminares, com diferentes proporções de  $\alpha$ -amilase ( $70^{\circ}\text{C}$ ) e glucoamilase ( $55^{\circ}\text{C}$ ) em banho termostatizado, por 30 minutos. Os graus de hidrólise foram avaliados mediante a quantificação dos açúcares redutores, pelo método de Somogyi-Nelson (Southgate, 1976). A fim de avaliar a fermentabilidade do meio hidrolisado, inoculou-se o mesmo com células de levedura em fermentômetros (recipiente amplamente utilizado em indústria viti-vinícola para se medir a atividade fermentativa de linhagens de leveduras), possibilitando o acompanhamento do processo por meio de pesagens sucessivas do conjunto, sendo a perda de peso observada, decor-

rente do despreendimento de  $\text{CO}_2$ . As condições de hidrólise enzimática, eleitas como ótimas, foram empregadas para o preparo do meio de fermentação e o teor de açúcar inicial, corrigido com a adição de xarope de sacarose estéril para se obter a concentração desejada de etanol na bebida.

### **Processo Fermentativo**

A fermentação semi-sólida foi conduzida por batelada simples com três repetições, em cubas cilíndricas de acrílico, geometricamente iguais, com capacidade nominal de 4,5 litros, a  $29^{\circ}\text{C}$  e o processo monitorado a intervalos de 24 horas. De cada cuba, amostras foram retiradas para determinações analíticas (triplicatas) das variáveis de interesse do processo fermentativo.

### **Determinações Analíticas**

Além das análises físico-químicas para a determinação de amido e carotenóides, empregadas na caracterização da matéria-prima, foram ainda utilizadas as seguintes técnicas para o acompanhamento do processo fermentativo.

**Tabela 1.** Composição química da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) *in natura*, pertencente a raça Solimões

<b>Constituintes*</b>	<b>in natura</b>
Umidade (%)	46,1 $\pm$ 0,4
Proteínas (%)	1,3 $\pm$ 0,1
Lipídios (%)	5,9 $\pm$ 0,4
Amido (%)	44,3 $\pm$ 0,3
Fibra Total (%)	0,7 $\pm$ 0,1
Cinza (%)	0,7 $\pm$ 0,2
Carotenóide (mg/100g)	2,5 $\pm$ 0,3

\* base úmida

**Tabela 2.** Análises físico-químicas da bebida fermentada

<b>Constituintes</b>	<b>Média*</b>
PH	3,9
Acidez (g/L)	2,7
Açúcares redutores (g/L)	0,16
Sólidos solúveis (Brix)	6,4
Etanol (g/L)	75,1
Carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ )	7,0

\* Os valores representam média de triplicatas e os desvios não ultrapassaram 1,8 % das medidas realizadas

tativo: avaliação da viabilidade celular, por contagem de células em Câmara de Neubauer, empregando-se azul de metileno como corante vital (Alves e Morais, 1998); teor alcoólico, após destilação de amostras em fase aquosa e posterior medida, por densimetria (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985); pH, por potenciometria; acidez, por titulometria com NaOH 0,01N; sólidos solúveis, por refratometria e açúcares redutores, pelo método de Somogyi-Nelson (Southgate, 1976).

### Variáveis de Resposta

Os valores de extensão da hidrólise enzimática do amido (EH), fator de conversão de substrato consumido em etanol ( $Y_{p/S}$ ), e a produtividade em etanol ( $Q_p$ ) foram calculados de acordo com as seguintes expressões:

$$EH (\%) = [(A_o - A_f)/A_o] \times 100$$

$$Y_{p/S} = (\Delta P)/(-\Delta S) = (P_f - P_o)/(S_o - S_f) [=] gP/gS$$

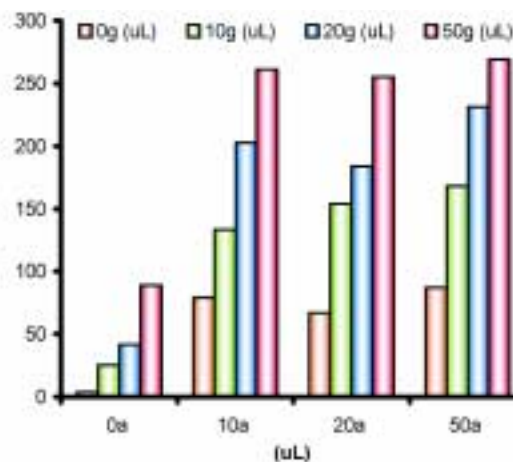
$$Q_p = (P_f - P_o)/t_f [=] gP/L.h$$

Onde: A: amido; P: concentração de etanol; S: concentração de substrato;  $t_f$ : tempo de fermentação. Os índices 'o' e 'f' representam as condições inicial e final, respectivamente.

### Preparo da Bebida e Análises Sensoriais

Após sete dias de fermentação, procedeu-se à decantação, filtração, acondicionamento em garrafas de vidro de 1 litro, fechamento hermético, pasteurização por imersão das garrafas em água a 85 °C por dez minutos, resfriamento em banho de água com gelo, e estocagem a, aproximadamente, 6 °C. Ao final de 30 dias, a bebida foi avaliada quanto ao pH, açúcares redutores residuais (Somogyi-Nelson), sólidos solúveis, grau alcoólico e carotenóides totais (Higby, 1972).

Foram realizados testes preliminares para se determinar o grau de doçura ideal na bebida. Essas formulações (0, 3, 6, 9 e 12% (p/v) de sacarose) foram submetidas à análise sensorial, utilizando-se escala hedônica (Monteiro, 1984). A bebida com o grau de edulcoração eleito foi analisada sensorialmente por 35 pessoas não treinadas, avaliando-se as



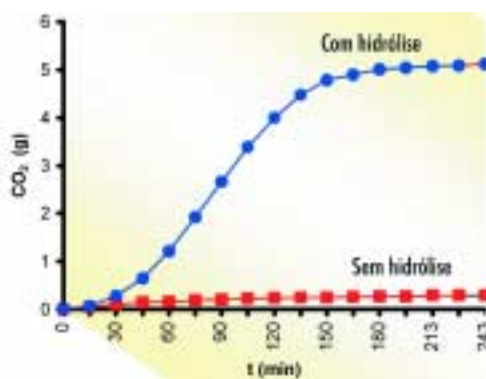
**Figura 4.** Efeito das combinações de  $\alpha$ -amilase (a) e glucoamilase (g) na hidrólise do amido de pupunha

características de sabor, aparência, cor e aroma, pelo método descrito por Monteiro (1984).

Os resultados foram analisados estatisticamente, aplicando-se a análise de variância e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

### Resultados e Discussão Características da matéria-prima

Os cachos de pupunha pesavam entre 0,9 a 5,0 kg e continham de 25 a 150 frutos, com peso médio de 36 g e diâmetros longitudinal e transversal de 4,5 e 4 cm, respectivamente. O rendimento em polpa, considerado elevado, foi de 71,2% em relação ao fruto integral. A Tabela 1 mostra a composição da polpa *in natura*, considerando-se os principais componentes. O alto conteúdo de amido e o baixo teor de lipídeos dos frutos indicam sua utiliza-



**Figura 5.** Evolução de CO<sub>2</sub> na fermentação do meio hidrolisado enzimaticamente

ção como matéria prima para produção de bebidas alcoólicas. De acordo com Clement (1987), há uma grande variabilidade em relação à composição de pupunhas encontradas na região Amazônica, havendo raças que produzem frutos pequenos, fibrosos, com elevados teores de lipídeos e baixos conteúdos de amido ou vice-versa.

### Hidrólise do Amido

Para a hidrólise do amido, utilizaram-se as enzimas  $\alpha$ -amilase e glucoamilase, como descrito na seção de Materiais e Métodos. Os resultados estão exibidos no gráfico da Figura 4, onde se observa, inicialmente, a imprescindibilidade da  $\alpha$ -amilase para uma hidrólise mais eficiente do amido. As melhores quantidades de enzimas para o processo hidrolítico foram atingidas com 10  $\mu$ L e 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase, respectivamente, tendo sido essa proporção utilizada para o preparo do meio de fermentação.

A extensão da hidrólise do amido presente na pupunha foi de, aproximadamente, 90 %. A alta eficiência da hidrólise foi também confirmada em experimento paralelo, conduzido em fermentômetro, onde se observou expressiva evolução de CO<sub>2</sub> (Figura 5). Apesar do curto tempo de fermentação (em torno de 4 horas), a alta concentração de células e as condições de anaerobiose no fermentômetro, contribuíram para que o etanol fosse produzido com apreciável fator de conversão do substrato consumido no produto (0,38 g/g), considerando-se ser esse um ensaio preliminar conduzido em condições de fermentação rápida (com inóculo maciço).

### Processo fermentativo

O meio de fermentação submetido à hidrólise prévia do amido foi adicionado de xarope de sacarose, nas cubas de fermentação, formando-se um sistema semi-sólido de massa homogênea e pastosa. A formação de bolhas de gás (CO<sub>2</sub>) no interior da massa foi observada cerca de três horas após a inoculação e tornou-se menos intensa após 48 horas. A coloração alaranjada do meio permaneceu inalterada e a consistência da massa tornou-se mais fluida.

O teor de sólidos solúveis, compos-

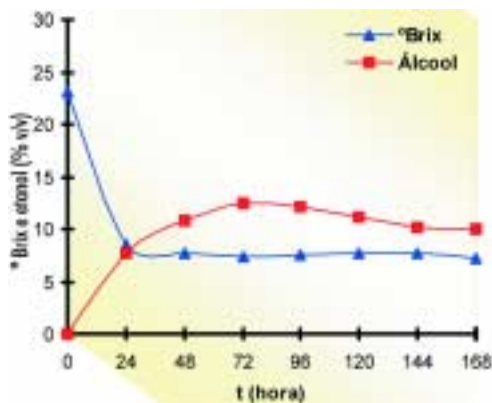
to em sua maioria por açúcares provenientes da hidrólise do amido e da adição do xarope, decresceu em função do consumo de açúcares fermentáveis. A produção máxima de etanol (12% v/v) foi atingida no período de 72 horas após o início da fermentação, diminuindo ligeiramente até o final do processo (Figura 6), sugerindo a possibilidade de redução no tempo de fermentação, desde que essa estratégia não interfira nas características de sabor e aroma da bebida.

Com 72 h de fermentação, o rendimento de substrato consumido em etanol foi de 0,49 g/g, correspondendo a uma eficiência de fermentação de 95,5 %. A produtividade máxima foi alcançada no tempo de 24 horas, apresentando o valor de 2,6 g de etanol/L.h.

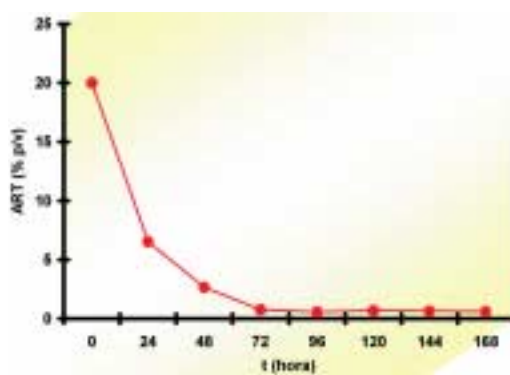
O perfil de consumo de açúcares redutores totais (Figura 7) coaduna-se com o de produção de etanol e com a variação de sólidos solúveis (Figura 6). Observa-se que o maior consumo de açúcar ocorre nas primeiras 24 horas do processo, diminuindo, posteriormente devido às elevadas concentrações de etanol e à escassez de substrato.

O decréscimo do pH e, consequentemente, o aumento da acidez do meio de fermentação (Figura 8) estão associados à formação de ácidos orgânicos (ácidos succínico, láctico, acético e outros), como amplamente reportada na literatura (Ribéreau-Gayon & Peynaud, 1966). É importante ressaltar que a evolução da acidez durante a fermentação influencia a estabilidade e a coloração de bebidas fermentadas (Rizzon *et al.*, 1998), assim como valores de pH entre 3 e 4 dificultam contaminações bacterianas (Aquarone *et al.*, 1986). Os carotenóides totais mantiveram-se inalterados (4,7 mg/100g) durante todo o curso da fermentação.

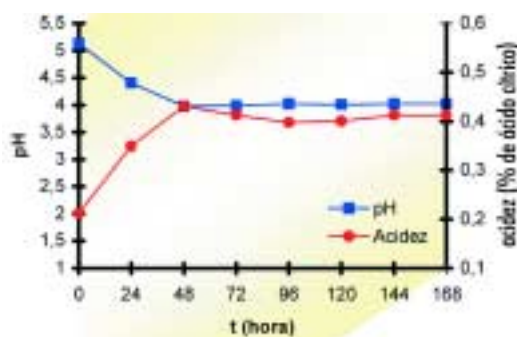
A taxa de mortandade celular aumentou com o curso da fermentação, tornando-se mais acentuada após 96 horas, devido à alta concentração de etanol no meio fermentado (12,2% v/v). Na fermentação alcoólica, o principal responsável pela diminuição da viabilidade celular é o seu próprio produto, cuja ação tóxica reflete-se na desorganização da membrana citoplasmática, de composição fosfolipídica, alterando sua integridade. Como con-



**Figura 6.** Perfil cinético da produção de etanol em meio de fermentação com amido de pupunha hidrolisado



**Figura 7.** Cinética do consumo de açúcares redutores totais (ART) na fermentação alcoólica de hidrolisado de pupunha



**Figura 8.** Variação da acidez do meio na fermentação alcoólica de hidrolisado de pupunha

seqüência ocorre a liberação de metabólitos importantes para o meio externo, bem como a entrada de substâncias, através da membrana, de forma não seletiva (Duarte *et al.*, 1996; Jones, 1988; Pereira Jr., 1999). Isso resulta na perda da viabilidade celular (Figura 9).

É importante ressaltar que o microrganismo agente do processo fermentativo foi uma levedura de panificação,

que não era a mais adequada à produção de etanol, tendo em vista que o processo industrial para a sua produção, a batelada alimentada, é conduzida em condições de elevada aeração e baixas concentrações de glicídeos no meio, a fim de minimizar os clássicos fenômenos de repressão catabólica. Como consequência às condições impostas no presente trabalho, que visavam a produção de etanol por batelada simples com elevadas concentrações de glicídeos em sistema não aerado, a levedura apresentou bom desempenho no que tange à atividade fermentativa, ainda que apresentasse elevadas taxas de mortandade, decorrentes do efeito deletério de seu próprio produto.

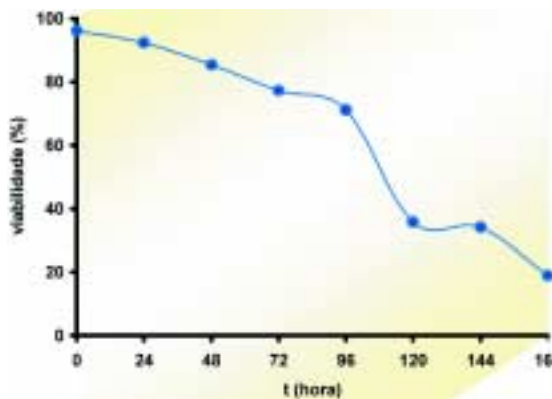
### Características gerais da bebida

A bebida fermentada apresentou sabor e aroma agradáveis, aspecto límpido e coloração amarelo-alaranjado (Figura 10). As características físico-químicas (Tabela 2) mostram que a concentração de etanol (75,11 g/L) foi superior à encontrada (11,83 g/L) por Sotero (1996), estudando a produção de 'caçuma' de pupunha por fermentação espontânea.

A maioria dos carotenóides totais presentes na massa foi removida juntamente com os lipídios durante o processo de filtração para obtenção da bebida, o que seguramente está atrelado às características lipossolúveis desses terpenóides.

O teor de açúcar na bebida foi bastante reduzido, decorrente do consumo praticamente total durante o processo de fermentação. Considerando não haver um grau de edulcoração definido, a escolha da proporção de açúcar efetuada através de análise sensorial mostrou que a proporção de sacarose de maior preferência foi de 9 %, com 85,7 % de aceitação.

A fim de se verificar a aceitabilidade da bebida já edulcorada, procedeu-se a uma nova análise sensorial cobrindo-se os requisitos aparência, aroma, sabor e cor. Os resultados desse ensaio estão apresentados na Figura 11, na qual se registram graus satisfatórios, superiores a 3,5. Alguns provadores afirmaram que o aroma exalado pela bebida asse-



**Figura 9.** Viabilidade celular de *S. cerevisiae* durante o processo de produção da bebida alcoólica do hidrolisado de pupunha



**Figura 10.** Bebida alcoólica de pupunha

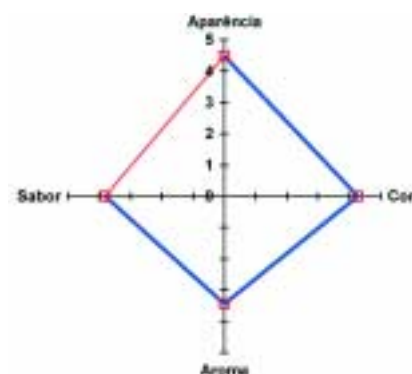
melha-se ao de mel e manga. De uma forma geral, a bebida obteve um bom nível de aceitabilidade; em torno de 80%.

### Conclusões

O Brasil é a maior reserva continental de solos agricultáveis de potencial ainda não integralmente aproveitado. Mesmo assim o nosso país é o terceiro maior exportador mundial de alimentos. Sabe-se, ainda, que o mercado de bebidas convencionais responde por uma parcela significativa da economia brasileira, encontrando-se nesse segmento industrial as maiores empresas da área de alimentos. No entanto, apesar de se constatar uma crescente demanda por distintos sabores de origem natural, a comercialização de novas bebidas constitui um mercado pouco explorado. Nesse contexto, a produção de bebidas fermentadas, oriunda de frutos tropicais da região Amazônica, desponta como uma interessante alternativa para novos mercados por apresentar perspectivas de alta lucratividade,

e de um bom retorno de investimento de capital. O presente trabalho demonstra ser factível produzir bebida alcoólica de pupunha, fruto abundante na região Amazônica e amplamente consumido pela população do Norte brasileiro. O desenvolvimento dessa tecnologia exigiu hidrólise enzimática prévia, tendo em vista a expressiva composição amilácea do fruto, seguida de processo fermentativo. A bebida resultante apresentou alto teor alcoólico e excelentes propriedades organolépticas. Tais características sinalizam um futuro promissor para esse inexplorado mercado.

A bebida resultante apresentou alto teor alcoólico e excelentes propriedades organolépticas. Tais características sinalizam um futuro promissor para esse inexplorado mercado.



**Figura 11.** Diagrama gráfico do teste classificatório do perfil da bebida

### Agradecimentos

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado para a primeira autora e ao BASA (Banco da Amazônia S.A.), que acreditou em nossa proposta, aprovando um projeto que recentemente se iniciou no âmbito do PROBEM/BIOAMAZÔNIA, para continuidade deste trabalho.

### Referências Bibliográficas

ALVES, S. B. & MORAES, S. A. (1998). Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Ed. FEALQ, Piracicaba-SP, 765-774.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A. L. & BORZANI, W. (1986). **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**. Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo-SP. v. 5, 243p.

ARKCOLL, D.B. & AGUIAR, J.P.L.

(1984). Peach palm (*Bactris gasipaes*) a new source of vegetable oil from the tropics. **J. Sci. Food Agric.**, 35, 520-526.

CLEMENT, C. R. & MORA-URPI, J. E.. Pejibaye Palm (*Bactris gasipaes* H. B. K. Aracaceae): Multi-use potential for the lowland Humid Tropics. (1987). **Jour. Econ. Bot.**, 42 (2), 302-311.

CLEMENT, C. R. (2000). **Comunicação pessoal**, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM.

DUARTE, M. C. T., SERZEDELLO, A.; SERRA, G. E.; FAVERI, M. C.; OLIVEIRA, L.; PONEZI, A. N. & SARTORATTO, A. (1996). Effect of lecithin and soy oil the fermentative performance of *Saccharomyces uvarum* 1904. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, 27, 255-262.

HARRIS, E. L.V. & ANGAL, S. (1994). **Protein purification methods**. Ed. IRL PRESS, 6ª ed., Oxford, England, 317p.

HIGBY, W. K. (1962). A simplified method for determination of some aspects of the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal Food Science**, 27 (1), 42-49.

INSTITUTO ADOLPHO LUZT. (1985). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. **Normas Analíticas** v. 1. 3ª ed. São Paulo-SP., 317p.

JONES, R. P. (1988). Intracellular ethanol – accumulation and from yeast and other cell. **FEMS Microbiol. Rev.**, 54, 239-258.

PEREIRA JR., N. (1999). Bioprocessos industriais. **In: Tecnologia Enzimática**. eds. BON, E. P. S. & PEREIRA JR., N. Rio de Janeiro-RJ. 1ª ed.. 110p

MONTEIRO, C. L. B. (1984). **Técnicas de avaliação sensorial**. Curitiba-PR, CEP-PA, 2ª. ed., 101p.

RANGANNA, A. (1986). **Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products**. 27-30.

RIBÉREAU-GAYON, J. & PEYNAUD, E. (1966). **Analise e controllo dei vini**. Edizioni Agricoli Bologna, 543 p.

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C. & MIELE, A. (1998). Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 18 (2), 179-183.

SOTERO, V. E.; GARCIA, D. & LESSI, E. (1996). Bebida fermentada a partir de pajuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K.) parámetros y evolucion. Iquitos-Peru. **Folia Amazônica**, 8(1), p. 5-18.

SOUTHGATE, D. A. T. (1976). **Determination of food carbohydrates**. Ed. Applied Science Publishers LTD., London-UK., 28-47.