

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO
PROCESSO FERMENTATIVO PARA A PRODUÇÃO
DE VINHO BRANCO A PARTIR DA UVA ITÁLIA

Fernando José de Góes

São Carlos – SP

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO
PROCESSO FERMENTATIVO PARA A PRODUÇÃO
DE VINHO BRANCO A PARTIR DA UVA ITÁLIA

Fernando José de Góes

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químico.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos – SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G598do

Góes, Fernando José de.

Desenvolvimento e otimização do processo fermentativo para a produção de vinho branco a partir da uva Itália / Fernando José de Góes. -- São Carlos : UFSCar, 2005. 157 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fermentação alcoólica. 2. Vinho e vinificação. 3. Uva Itália. 4. Otimização multivariável. 5. Engenharia bioquímica. I. Título.

CDD: 663.13 (20^a)

AGRADECIMENTOS

São inúmeras as pessoas a quem devo agradecer, não somente pela realização deste trabalho, mas também pelo convívio, amizade e pela contribuição à minha formação profissional e pessoal. Assim, agradeço:

A Deus por tudo o que é e representa para mim.

À Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami pela orientação, paciência, amizade e principalmente pela ousadia de acreditar numa pesquisa voltada para a prática.

Ao Prof. Dr. Jorge José Corrêa Lopes (UFSCar-ARARAS) por aceitar o convite para ser membro da banca examinadora da minha qualificação e principalmente pelas contribuições e sugestões propostas.

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior pela colaboração e pelas importantes dicas pertinentes, que contribuíram muito para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, minhas irmãs e a Beatriz, por tudo que fizeram e fazem por mim. Espero um dia poder retribuir-lhes, pois não há palavras que consigam expressar toda minha gratidão.

À Fernanda, pelo carinho, amor, dedicação, incentivo e paciência que tem comigo, apesar da distância e saudades, infelizmente não sei escrever palavras bonitas para expressar meu carinho e amor por uma pessoa tão querida.

Aos familiares da Vitivinícola Góes, em especial ao meu tio Tito, pelos sábios conselhos sobre produção de vinho e grande confiança que demonstrou por mim, permitindo a realização dos testes práticos.

Ao Dr. Álvaro Baptista Neto pela grandiosa colaboração nos experimentos e na aprendizagem das “manhas” para se trabalhar no Laboratório de Bioquímica do DEQ. Meu muito obrigado.

Ao técnico Amadeus por sempre facilitar minha vida com relação à execução dos experimentos e análises, além de sempre favorecer minha distração, ou melhor, minha vida social com as discussões sobre nosso tricolor.

Aos companheiros de laboratório pelo apoio na pesquisa, pelas boas risadas compartilhadas e por não se zangarem com meus deslizes: Juliana, Sheila, Izara, Carolina, Marcel, Luciana Brites, Marcelo, Clovis, Kamilla, Patrícia, Vanessa.

Aos companheiros cearenses Wellington, Dasciana e Alexandre, ao catalítico Kleper que me ajudaram muito e também fizeram eu dar muita risada.

Aos grandes amigos das Kits Goiano (Wellington) e Frango (Guilherme) por auxiliarem em alguns problemas e proporcionarem momentos de muita descontração e palhaçada.

À minha amiga Érica, a qual conquistou minha amizade mesmo com todo aquele tamanho. Valeu “Menina Grande”.

À Capes pelo auxílio concedido.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso de mais uma etapa de minha vida, que embora não tenham seus nomes escritos aqui podem ter certeza que estarão sempre guardados na minha memória.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 DEFINIÇÃO DE VINHO	4
2.2 COMPOSIÇÃO DO VINHO.....	4
2.2.1 AÇÚCARES.....	4
2.2.2 ÁLCOOIS.....	5
2.2.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS	6
2.2.4 ANIDRIDO SULFUROSO	7
2.3 VARIEDADES DE UVAS E ASPECTOS ECONOMICOS DO VINHO	7
2.4 VINDIMA OU COLHEITA DA UVA.....	14
2.5 OBTENÇÃO E CORREÇÃO DO MOSTO	16
2.6 MICROBIOLOGIA DO VINHO	18
2.6.1 LEVEDURAS	18
2.6.2 SUCESSÃO DE ESPÉCIES DE LEVEDURA DURANTE A VINIFICAÇÃO.....	21
2.6.3 LEVEDURAS DE CONTAMINAÇÃO	22
2.6.4 EMPREGO DE LEVEDURA NA VINIFICAÇÃO.....	22
2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	26
2.7 INFLUÊNCIA DOS AGENTES FISICOS E QUIMICOS SOBRE A FERMENTAÇÃO	28
2.7.1 TEMPERATURA.....	28
2.7.2 pH	29
2.7.3 ÁLCOOL	31
2.7.4 GÁS CARBÔNICO.....	32
2.7.5 OXIGÊNIO	32
2.7.6 ANIDRIDO SULFUROSO	32
2.8 FERMENTAÇÃO GLICERICA	35
2.9 VINIFICAÇÃO EM BRANCO	36
2.9.1 ESMAGAMENTO E DESENGAÇAMENTO.....	36
2.9.2 ESCORRIMENTO.....	37

2.9.3	PRENSAGEM.....	37
2.9.4	SULFITAGEM.....	38
2.9.5	DEFECAÇÃO.....	38
2.9.6	TRASFEGA.....	40
2.9.7	CORREÇÃO DO MOSTO.....	40
2.9.8	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	43
2.9.9	CLARIFICAÇÃO.....	44
2.9.10	CONSERVAÇÃO.....	47
2.9.11	ENVELHECIMENTO.....	48
2.10	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	49
2.10.1	APLICAÇÃO DE MÉTODOS ESTATÍSTICOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
2.10.2	PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS.....	50
2.10.3	PLANEJAMENTO FATORIAL.....	51
2.10.4	METODO DE ANÁLISE POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	53
2.11	OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE MULTI-RESPOSTA.....	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1	MICROORGANISMO.....	57
3.2	MEIOS DE CULTIVO.....	57
3.2.1	PREPARO DO MEIO SÓLIDO PARA A CONSERVAÇÃO DO MICROORGANISMO.....	57
3.2.2	PREPARO DO MOSTO.....	58
3.2.3	PREPARO DO MEIO PARA REATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS SELVAGENS E SELECIONADAS.....	59
3.2.4	PREPARO DO MEIO PARA AS FERMENTAÇÕES.....	60
3.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
3.3.1	CONSERVAÇÃO E PREPARO DA CULTURA ESTOQUE.....	60
3.3.2	DESCRIÇÃO DE UM ENSAIO TÍPICO.....	61
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	65
3.4.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (A.R.T.).....	65
3.4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....	68
3.4.3	ANÁLISES DO ETANOL E GLICEROL.....	70
3.4.4	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ VOLÁTIL.....	71

3.5	PROCEDIMENTO EMPREGADO NA VINÍCOLA GÓES PARA A PRODUÇÃO DE VINHO.....	72
3.5.1	PROCEDIMENTO TRADICIONAL.....	72
3.5.2	MODIFICAÇÕES DO PROCESSO TRADICIONAL.....	75
3.6	CÁLCULO DAS VARIÁVEIS RESPOSTAS.....	77
3.6.1	PRODUTIVIDADE EM ETANOL ($PROD_{Et}$).....	77
3.6.2	RENDIMENTO EM ETANOL (η_{Et}).....	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1	PRODUÇÃO DE ETANOL, GLICEROL, CÉLULAS E CONSUMO DE A.R.T. DURANTE OS CULTIVOS.....	79
4.2	PRODUÇÃO DE ETANOL, GLICEROL, CÉLULAS E CONSUMO DE A.R.T. AO FINAL DA FERMENTAÇÃO TURBULENTE E NOS VINHOS FINAIS.....	96
4.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS.....	104
4.3.1	PRODUTIVIDADE EM ETANOL ($PROD_{Et}$).....	105
4.3.2	CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL (C_{GLIC}).....	108
4.3.3	CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL ($C_{Ac.V}$).....	109
4.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	112
4.5	DADOS OBTIDOS NA VINÍCOLA.....	115
5	CONCLUSÕES.....	122
6	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	124
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	125
	APÊNDICE A.....	130
	APÊNDICE B.....	154

RESUMO

Com a redução do plantio de uvas em São Roque (SP), as vinícolas da região vem buscando alternativas para a produção de vinhos comuns com baixo custo. No presente trabalho estudou-se a produção de vinho proveniente da uva Itália obtida na Vitivinícola Góes (São Roque) com leveduras selvagens (obtidas nas dornas da própria vinícola) e leveduras selecionadas secas e ativas Mauriferm® Y-904 da COATEC. Seguindo um planejamento fatorial 2² ampliado com expansão estrela foram realizados 44 ensaios em biorreatores de bancada com volume de trabalho de 1L, cujas condições de fermentação foram pH iniciais de 2,8, 3,0, 3,3, 3,6 e 3,8 e temperaturas de 18, 20, 24, 28 e 30°C, sendo 22 com e 22 sem a presença da casca. Esses ensaios permitiram investigar a influência da temperatura e do pH inicial na formação de etanol, glicerol e acidez volátil durante fermentações realizadas na presença e ausência da casca, além disso, avaliar as vantagens e desvantagens das leveduras selecionadas frente às leveduras selvagens.

Os resultados mostraram ótima produção de etanol nas fermentações com uva Itália, obtendo-se aproximadamente 10°GL. Observou-se também forte influência da presença ou não da casca durante a fermentação, pois os vinhos produzidos na ausência de casca apresentavam coloração menos amarelada e um aroma mais agradável do que o produzido com a casca. Além disso, observou-se que as leveduras selvagens apresentaram maior rendimento na transformação de açúcar em álcool do que as leveduras selecionadas, entretanto as últimas produziram maior teor de glicerol do que as primeiras. Também se notou que a otimização apresentou resultados coerentes com os obtidos nos experimentos.

A viabilidade de implementar a fermentação na ausência de casca e de utilizar a levedura selecionada em condições reais de produção foi investigada em ensaios realizados na Vitivinícola Góes em dornas de 1000 L. Os resultados obtidos foram compatíveis com os dos ensaios de bancada, porém foram atingidos menores valores para a concentração final de etanol em decorrência da ausência de controle de temperatura que provoca maiores perdas de etanol por evaporação.

A maior contribuição do presente trabalho, testada nos ensaios de bancada e confirmada nas fermentações realizadas na Vinícola, é o desenvolvimento de um método simples de remoção da casca antes da fermentação, que resulta em melhorias significativas na qualidade do vinho branco produzido a partir da uva Itália.

ABSTRACT

With the reduction of vineyards in São Roque, the wine industry of this region has been seeking for alternatives to produce common wine with low cost. In the present work, wine production from Italia grape obtained at the Góes Wine-cellar (São Roque – SP) with the wild yeast and the selected yeast (Y-904 Mauriferm from COATEC) was studied. Following a 2^2 factorial design complemented with a star configuration 44 experiments were carried out in bench scale bioreactors with 1 L working volume, whose fermentation conditions were initial pH values of 2.8, 3.0, 3.3, 3.6 and 3.8 and temperatures of 18, 20, 24, 28 and 30°C, being 22 with and 22 without skin. These experiments permitted to study the influence of initial pH and temperature in the ethanol and glycerol formation during turbulent fermentations in the presence and absence of skin. Besides, the advantages and disadvantages of the selected yeast in comparison to the wild yeasts were also evaluated.

The results showed that high ethanol production from the Italia grape variety could be achieved, reaching up to 10 °GL. It was also observed a strong influence of the skin presence during the fermentation, but the wine made in the absence of skin produced colorless white wines with more pleasant flavours than the wines made in presence of skin. Furthermore, was observed that the wild yeast showed higher yield in converting sugar to alcohol than the selected yeast, however the later made higher glycerol concentration than the former. It was also noticed that the optimization results were consistent to the experimental ones.

The feasibility of implementing the fermentation in the absence of skin as well as of employing the selected yeast in real production conditions was investigated by performing experiments in 1000L vats of Goes Wine-cellar. The results attained were compatible with the ones from the bench scale experiments. However, smaller values for the final ethanol concentration were observed as a consequence of the lack of temperature control, which caused more losses of ethanol due to evaporation.

The major contribution of the present work, tested in the lab experiments and confirmed in the fermentations carried out at the Wine-cellar, is the development of a simple method for skin removal prior fermentation, which resulted in an important improvement in the quality of white wine made from Italia grape.

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 2.1 – Reprodução assexuada por brotamento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , observado com um aumento de 400 vezes.....	21
Figura 2.3 – Seqüência de reações para a formação de etanol e glicerol, conduzida por <i>Saccharomyces</i>	30
Figura 2.4 – Seqüências de reações do Ciclo de Krebs.....	33
Figura 2.5 – Seqüência de cálculos para obter a Equação 2.1	41
Figura 3.1 – Foto da uva Itália.....	58
Figura 3.4 – Fermentadores utilizados nos 44 ensaios	64
Figura 3.5 – Esquema do procedimento empregado na preparação das fermentações.....	65
Figura 3.3 – Cromatograma ilustrando os diversos componentes de uma amostra, com seus respectivos picos e tempos de retenção	71
Figura 3.6 – Esquema do procedimento empregado pela Vinícola Góes para a produção de vinho.....	76
Figura 4.1 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 1 (T=20°C e pH=3,0, sem casca e com levedura selvagem)	81
Figura 4.2 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 2 (T=20°C e pH=3,6, sem casca e com levedura selvagem)	82
Figura 4.3 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 3 (T=28°C e pH=3,0, sem casca e com levedura selvagem)	82
Figura 4.4 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 4 (T=28°C e pH=3,6, sem casca e com levedura selvagem).	82
Figura 4.5 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 5 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)	83
Figura 4.6 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 6 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)	83
Figura 4.7 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 7 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)	83
Figura 4.8 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 8 (T=24°C e pH=3,8, sem casca e com levedura selvagem)	84

Figura 4.9 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 9 (T=30°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)	84
Figura 4.10 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 10(T=24°C e pH=2,8, sem casca e com levedura selvagem)	84
Figura 4.11 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 11(T=18°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)	85
Figura 4.12 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 12(T=20°C e pH=3,0, com casca e com levedura selvagem)	85
Figura 4.13 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 13(T=20°C e pH=3,6, com casca e com levedura selvagem)	85
Figura 4.14 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 14(T=28°C e pH=3,0, com casca e com levedura selvagem)	86
Figura 4.15 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 15(T=28°C e pH=3,6, com casca e com levedura selvagem)	86
Figura 4.16 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 16(T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)	86
Figura 4.17 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 17(T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)	87
Figura 4.18 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 18(T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)	87
Figura 4.19 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 19(T=24°C e pH=3,8, com casca e com levedura selvagem)	87

Figura 4.20 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 20(T=30°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)	88
Figura 4.21 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 21(T=24°C e pH=2,8, com casca e com levedura selvagem)	88
Figura 4.22 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 22(T=18°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)	88
Figura 4.23 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 23 (T=20°C e pH=3,0, sem casca e com levedura selecionada).....	89
Figura 4.24 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 24 (T=20°C e pH=3,6, sem casca e com levedura selecionada).....	89
Figura 4.25 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 25 (T=28°C e pH=3,0, sem casca e com levedura selecionada).....	89
Figura 4.26 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 26 (T=28°C e pH=3,6, sem casca e com levedura selecionada).....	90
Figura 4.27 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 27 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selecionada).....	90
Figura 4.28 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 28 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selecionada).....	90
Figura 4.29 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 29 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selecionada).....	91
Figura 4.30 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 30 (T=24°C e pH=3,8, sem casca e com levedura selecionada).....	91

Figura 4.31 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 31 (T=30°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selecionada).....	91
Figura 4.32 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 32 (T=24°C e pH=2,8, sem casca e com levedura selecionada).....	92
Figura 4.33 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 33 (T=18°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selecionada).....	92
Figura 4.34 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 34 (T=20°C e pH=3,0, com casca e com levedura selecionada).....	92
Figura 4.35 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 35 (T=20°C e pH=3,6, com casca e com levedura selecionada).....	93
Figura 4.36 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 36 (T=28°C e pH=3,0, com casca e com levedura selecionada).....	93
Figura 4.37 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 37 (T=28°C e pH=3,6, com casca e com levedura selecionada).....	93
Figura 4.38 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 38 (T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selecionada).....	94
Figura 4.39 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 39 (T=24°C e pH=3,3 com casca e com levedura selecionada).....	94
Figura 4.40 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 40 (T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selecionada).....	94
Figura 4.41 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 41 (T=24°C e pH=3,8, com casca e com levedura selecionada).....	95

Figura 4.42 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 42 (T=30°C e pH=3,3, com casca e com levedura selecionada).....	95
Figura 4.43 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 43 (T=24°C e pH=2,8, com casca e com levedura selecionada).....	95
Figura 4.44 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 44 (T=18°C e pH=3,3, com casca e com levedura selecionada).....	96
Figura 4.45 – Superfícies de resposta representando a variação da produtividade de etanol em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selvagem na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).	107
Figura 4.46 – Superfícies de resposta representando a variação da produtividade de etanol em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selecionada na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).	107
Figura 4.47– Superfícies de resposta representando a variação na concentração de glicerol máxima em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selecionada na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).	109
Figura 4.48 – Superfícies de resposta representando a variação na concentração de acidez volátil em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selvagem na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).	111
Figura 4.49 – Superfícies de resposta representando a variação na concentração de acidez volátil em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selecionada na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).	112
Figura 4.50 – Variação (a) da concentração de etanol (◆), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V– 1 (com casca e com levedura selvagem).....	116
Figura 4.51 – Variação (a) da concentração de etanol (◆), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V– 2 (com casca e com levedura selecionada)	117
Figura 4.52 – Variação (a) da concentração de etanol (◆), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V– 3 (sem casca e com levedura selvagem).....	117

Figura 4.53 – Variação (a) da concentração de etanol (◆), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V– 4 (sem casca e com levedura selecionada)	117
Figura 4.54 – Vinho final obtido pelos experimentos V–2 (com casca) e V–4 (sem casca) ambos fermentados com levedura selecionada na Vitivinícola Góes.	119

1 INTRODUÇÃO

Não se pode apontar precisamente o local e a época em que o vinho foi feito pela primeira vez. O vinho não teve que esperar para ser inventado: ele estava lá, onde quer que uvas fossem colhidas e armazenadas em um recipiente que pudesse reter seu suco. Mas, é imprescindível lembrar das descobertas sobre os microrganismos e sobre a fermentação feitas por Louis de Pasteur (1822-1895) e publicadas na sua obra "Études sur le Vin". Essas descobertas constituem o marco fundamental para o desenvolvimento da enologia moderna (CATALUÑA, 1984).

A partir do século XX a elaboração dos vinhos tomou novos rumos com o desenvolvimento tecnológico da viticultura e da enologia, propiciando conquistas tais como o cruzamento genético de diferentes cepas de uvas e o desenvolvimento de linhagens de leveduras selecionadas geneticamente. Ainda que pese o romantismo de muitos que consideram (ou supõem?) os vinhos dos séculos passados como mais artesanais e assim melhores, os vinhos do século XX e deste século têm, certamente, um nível de qualidade bem melhor do que os de épocas passadas.

Nesse ramo, a indústria brasileira possui efetivamente cerca de nove décadas de trabalho. Desde 1970 aos dias de hoje, a viticultura brasileira transformou-se industrialmente. Há os que afirmam que foi devido à vinda das multinacionais, que trouxeram consigo tecnologia e astúcia para se impor e se manter no mercado com o passar dos anos. Outros dizem que foi um fator inerente a elas – próprio da sua evolução.

Entretanto, é interessante ressaltar que o setor de vinhos brasileiro apresenta uma característica marcante que o distingue de outros mercados de vinhos. Enquanto o mercado estrangeiro somente aceita produtos originários das variedades européias (*V. vinífera*), já no Brasil, além dessas uvas, também se aceita produtos originários das variedades americanas (*V. labrusca* e *V. bourquina*) e híbridas (CATALUÑA, 1984).

Na região da Serra Gaúcha, a qual é responsável por mais de 90% da produção nacional de vinhos (em média 330 milhões de litros de vinhos e mostos anualmente), a produção de vinhos está dividida em vinhos comuns e vinhos finos, sendo cerca de 80% de vinhos comuns, elaborados a partir de uvas americanas e híbridas e 20% de vinhos finos, elaborados a partir de uvas viníferas (MELLO, 2005).

Embora sejam encontrados muitos estudos sobre a produção de vinho, poucas pesquisas abordam a matéria-prima e a utilização de novas espécies não comumente empregadas para a elaboração de vinhos. Analisando detalhadamente a produção de uvas cultivadas no Brasil, verifica-se que grande parte de nossa produção é mantida e sustentada pelas variedades comuns (Isabel, Seibel, Niágara, etc.). Apesar da importância do mercado de vinhos comuns, ainda não existe uma tecnologia totalmente voltada para a elaboração de vinho de uvas alternativas no que diz respeito à levedura a ser utilizada, a temperatura ideal de fermentação e ao tipo de tratamento que o mosto da uva deve sofrer na fase pré-fermentativa (DIAS *et al.*, 2003).

Além disso, sabe-se que no Brasil existe um grande desperdício pós-colheita para algumas culturas devido às exigências do mercado, em especial para a uva da variedade Itália. Deste modo, existe a necessidade de se desenvolver novos produtos que permitam a redução destas perdas e proporcionem um incremento na renda do agricultor.

No caso das vinícolas localizadas na região de São Roque, a busca por inovação tornou-se uma questão de sobrevivência, já que a diminuição da área de plantio das variedades de uvas tradicionais, em especial a Niagara e Isabel, tem forçado os vinicultores a comprar uvas e às vezes o próprio vinho no Estado do Rio Grande do Sul. A substituição das uvas tradicionais pela uva variedade Itália surge como a alternativa economicamente mais viável, já que a mesma é cultivada na região vizinha de São Miguel Arcanjo e vendida por um preço mais acessível ao vinicultor.

Cabe ainda ressaltar que a produção de vinho em São Roque, a partir da uva da variedade Itália, apresenta um custo menor do que a partir das uvas normalmente empregadas, pois são utilizadas uvas que não apresentam a qualidade necessária para serem vendidas diretamente ao consumidor.

Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar a produção de vinho branco comum a partir de uva "Itália", reproduzindo em laboratório as condições empregadas na Vitivinícola Góes de forma a: 1) investigar a influência da temperatura, do pH inicial, do emprego de leveduras selecionada ou selvagem e da presença ou ausência de casca na fermentação alcoólica do suco da referida uva em termos de produção de etanol, glicerol e acidez volátil; 2) empregar o planejamento experimental por análise de superfície de resposta para otimizar as

condições de cultivo que permitam a obtenção de um produto de boa qualidade a partir de uma uva de baixo custo; 3) determinar as vantagens e dificuldades de se implementar, na prática, as modificações necessárias para realizar a fermentação com leveduras selecionadas e na ausência de casca em ensaios conduzidos na Vitivinícola Góes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEFINIÇÃO DE VINHO

“O vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura”. Esta é a definição legal de vinho (BRASIL, 1988).

É importante ressaltar que em nosso país, segundo a legislação atualmente vigente, a bebida alcoólica é definida como um produto refrescante, aperitivo ou estimulante destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa e contendo mais de meio grau Gay-Lussac de álcool etílico. Assim, por exemplo, a cerveja e a sidra são refrescantes; os amargos são aperitivos; e os vinhos, licores e aguardentes são estimulantes.

Atualmente, diversas legislações, como a nossa e a norte americana, por exemplo, só permitem que se use o termo vinho para o fermentado proveniente das uvas. Os demais, elaborados com outras frutas devem obrigatoriamente, serem rotulados com a denominação vinho, acompanhado do nome da fruta que lhe deu origem, tal como vinho de laranja, vinho de pêra, vinho de jabuticaba, vinho de abacaxi e outros.

2.2 COMPOSIÇÃO DO VINHO

O conhecimento da composição química do vinho permite compreender melhor os fenômenos que ocorrem durante a maturação da uva e na elaboração, conservação e tratamentos do futuro vinho (HASHIZUME, 2001).

As principais substâncias que constituem o vinho são: açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, pectinas, gomas e mucilagens, compostos voláteis e aromáticos.

2.2.1 AÇÚCARES

O teor de açúcar da uva varia de 15 a 30% de seu peso em função de vários fatores, tais como o estágio de maturação, o clima, o solo e a variedade de uva. Dizem-se os açúcares da uva devido à facilidade da expressão, pois na realidade as uvas são constituídas quase que exclusivamente por glicose e frutose em proporções sensivelmente iguais no momento da maturação. Entretanto, sempre há um pouco mais da frutose que de glicose: a relação glicose/frutose é ao redor de 0,95. Durante a fermentação, essa relação diminui visto que a maioria das leveduras

fermenta de preferência a glicose. A uva contém traços de sacarose que desaparecem na fermentação. A uva ainda contém uma pequena quantidade de açúcares não fermentescíveis, cerca de 1g/L, e que se encontram no vinho. Entre eles estão as pentoses, sendo as principais a arabinose e a xilose. Por causa desses açúcares, jamais a dosagem de açúcares redutores é zero; no vinho seco seu teor situa-se entre 1 e 2g/L (HASHIZUME, 2001).

2.2.2 ÁLCOOIS

O álcool etílico é o constituinte mais importante do vinho após a água, a qual representa cerca de 85% a 90% (V/V). Segundo a legislação brasileira, para ser vinho, o fermentado de uva tem que conter no mínimo 7% (V/V a 20°C) de álcool (BRASIL, 2005), ou seja, uma concentração de etanol igual a 55,6g/L no mínimo. O glicerol é, após o álcool etílico, o constituinte do vinho mais importante, sendo encontrado normalmente em concentrações que variam de 4 a 10g/L (NIEUWOUDT, 2002). Do total de álcool presente no vinho cerca de 0,5% é representado por outros álcoois, tais como: metílico, isobutílico, isoamílico, hexílico, feniletílico, etc (HASHIZUME, 2001).

O glicerol é um álcool com três grupos C–OH. Seu sabor adocicado, quase igual ao da glicose, contribui para maciez do vinho. O glicerol é um produto da fermentação alcoólica, representando normalmente de 1/10 a 1/15 do peso de álcool etílico (HASHIZUME, 2001). Seu teor no vinho depende da espécie de levedura, da maturação da uva, do grau de infecção da uva por *Botrytis cinerea*, e das condições de fermentação, tais como choques térmicos (aumento e diminuição brusca de temperatura), adição de alto teor de SO₂, etc. (NIEUWOUDT, 2002).

O metanol está normalmente presente no vinho. É um álcool proveniente da hidrólise da pectina. Seu teor varia de 0 a 635mg/L, com a média de 100mg/L. Alguns fatores contribuem para o aumento de metanol no vinho, tais como: a adição de enzima pectinolítica ao mosto; vinhos obtidos por fermentação em tinto ou com casca; e vinhos obtidos por maceração prolongada de casca de uvas. Vinhos obtidos com uvas da variedade *Vitis labrusca* ou seus híbridos apresentam maior teor em metanol que os de *Vitis vinifera* (HASHIZUME, 2001). Alguns autores consideram que o consumo de 20mL provoca cegueira e que 60mL constitui a dose letal (BLIDER *et al.*, 1988) Os limites máximos tolerados para o metanol, em bebidas, são fixados pela legislação brasileira em 0,35g/L (BRASIL, 2005).

2.2.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS

As substâncias ácidas que se encontram na composição do vinho dividem-se em dois grupos distintos quanto a sua natureza: os ácidos orgânicos e os ácidos minerais. Os ácidos orgânicos existem no vinho tanto na forma livre quanto na combinada com potássio, cálcio, sódio, etc. Entretanto os ácidos minerais se encontram totalmente combinados formando sais. Deve-se salientar que os ácidos mais facilmente se combinam quanto maior for sua força ácida. Por exemplo, o ácido acético é um ácido fraco, por isso, ele é encontrado no vinho na forma livre, já os ácidos minerais são ácidos fortes, o que faz com que eles se combinem facilmente. Assim, a proporção na qual cada ácido se encontra no vinho, combinado ou livre, é variável, dependendo não somente do teor dos diferentes ácidos presentes no vinho, mas também da quantidade e qualidade das bases existentes (PATO, 1998).

Os ácidos voláteis são substâncias que possuem a propriedade de se volatilizar facilmente. Nos mostos das uvas sadias, os ácidos voláteis têm baixa concentração. Subtraindo da acidez total a acidez volátil se tem a acidez fixa. Assim é lógico admitir que em mostos normais a acidez fixa seja igual a acidez total.

Os principais ácidos orgânicos constituintes do vinho são: a) os provenientes da uva: tartárico, málico e cítrico; e b) os provenientes da fermentação: succínico, láctico e acético. A acidez fixa no vinho é basicamente formada pelos ácidos: tartárico, málico, succínico e cítrico. Já a acidez volátil é constituída pelos ácidos voláteis, sendo o acético o componente principal. O baixo teor em acidez volátil indica a boa sanidade do vinho (HASHIZUME, 2001).

O ácido acético, de fórmula geral $\text{CH}_3\text{—COOH}$, é o principal componente da acidez volátil do vinho. Ao destilar o vinho, o ácido volatiliza-se e é recolhido no condensador, o que não acontece com os ácidos fixos (málico, tartárico, láctico e succínico). Sua função ácida se dissocia de acordo com $\text{pK} = 4,73$. Ele é encontrado em vinho sadio em teor de aproximadamente 0,48g/L. Sua formação se dá através da fermentação alcoólica dos açúcares, da fermentação maloláctica e pelas bactérias acéticas.

É normal que todo vinho apresente acidez volátil porque o ácido acético é um produto secundário normal da fermentação alcoólica. A quantidade produzida numa fermentação de mosto saudável é sempre pequena: de 0,18g/L a 0,36g/L expresso em ácido acético. Seu teor depende muito da espécie de levedura, de sua associação, mas também da composição do mosto (acidez, teor em açúcares e

substâncias nitrogenadas) e das condições de fermentação (temperatura, aeração). Além disso, quando ocorre também a fermentação malolática, esta também sempre forma um pouco de acidez volátil, cerca de 0,12 a 0,24g/L (HASHIZUME, 2001).

Por outro lado, quando a acidez volátil está acima de 0,48g/L, expressa em ácido acético, pode indicar a ocorrência de doenças bacterianas no vinho. As bactérias acéticas em contato com o ar são capazes de oxidar o álcool etílico a ácido acético. Mais uma causa também freqüente de elevação da acidez volátil é o ataque de bactérias lácticas, na ausência de ar, a certos constituintes de mostos e vinhos. Entretanto, deve-se salientar que é permitido que o vinho apresente no máximo 20meq/L de acidez volátil (BRASIL, 2005), ou seja, 1,2g/L expresso em ácido acético.

2.2.4 ANIDRIDO SULFUROSO

O anidrido sulfuroso é um produto indispensável na elaboração de vinho. Seu limite de uso varia de acordo com a legislação de cada país. No Brasil, seu emprego é permitido até 250mg/L como SO₂ total (BRASIL, 2005). O teor como SO₂ livre no vinho foi abolido no Brasil bem como em muitos outros países. Entretanto, o conhecimento de SO₂ livre no vinho é muito importante, pois é livre que o SO₂ apresenta o caráter redutor. Ele atua sobre os microrganismos que se desenvolvem no vinho, sendo nocivo para todos, mas em grau diferente. Sendo assim, em função dessa propriedade e da dose empregada, age como elemento seletivo dos microrganismos. Por causa dessa característica, até o presente não existe outro produto que possa substituí-lo (HASHIZUME, 2001).

Deve-se salientar que os outros componentes do vinho, tais como: os sais, extrato (sólidos solúveis, excluindo os açúcares), compostos fenólicos, ésteres etc., apesar de sua importância na composição do vinho não foram detalhados nessa revisão por não influírem diretamente nos objetivos do presente trabalho.

2.3 VARIEDADES DE UVAS E ASPECTOS ECONOMICOS DO VINHO

A classificação botânica de uma videira é importante para facilitar a compreensão da grande variedade de uvas existentes e de vinhos obtidos a partir das mesmas.

A videira é uma planta sarmentosa pertencente à classe das *Dicotilidôneas*, ordem *Rámnidas* e da família das *Vitáceas*. Dentre os diversos gêneros desta

família, o gênero *Vitis* é o mais importante e apresenta mais de quarenta espécies onde estão incluídas todas as videiras europeias, americanas, asiáticas e híbridas (KUHN *et al.*, 1996).

Dentre as espécies citadas, as únicas que não apresentam nenhum interesse vitícola são as asiáticas, porém algumas delas são ornamentais, e por isso são cultivadas em jardins: *Vitis Coignetie*, *Vitis Romaneti*, *Vitis Lanata*, *Vitis Pedicelata* e a *Vitis Thumbergii* (CATALUÑA, 1984).

Com o intuito de diferenciar os vinhos de acordo com a variedade de uva que os origina, a legislação brasileira (BRASIL, 2004) classifica os vinhos de mesa de viníferas e de americanas. Deve-se salientar que segundo essa lei o vinho de mesa passou a ser definido como sendo o vinho com teor alcoólico de 8,6% a 14% (V/V a 20°C), podendo conter até uma atmosfera de pressão a 20°C. Assim:

- Vinho de mesa de viníferas é o vinho elaborado exclusivamente com uvas das variedades *Vitis vinífera*;
- Vinho de mesa de americanas é o vinho elaborado com uvas do grupo das americanas (*Vitis labrusca* e *Vitis bouquina*) e/ou híbridas, podendo conter vinhos de variedades *Vitis vinífera*.

Além dessa divisão a LEI N° 10.970 de 2004 (BRASIL, 2004) deu uma nova definição para os vinhos finos, os quais segundo essa lei são os vinhos com graduação alcoólica de 8,6% a 14% em volume, elaborados mediante processos tecnológicos adequados que assegurem a otimização de suas características sensoriais e exclusivamente de variedades *Vitis vinífera* do grupo Nobres.

Além disso, a legislação define também que Cortado é aquele vinho feito com a combinação de vinhos de uvas diferentes espécies, enquanto o varietal é o vinho produzido com uma determinada espécie de uvas. Assim, para a legislação brasileira, varietal pode ser um vinho produzido com pelo menos 60% de uma determinada espécie e misturado com outro vinho feito com uva do mesmo grupo (por exemplo, um merlot, mesclado com cabernet sauvignon). Portanto, o fato de o vinho ser varietal não é uma garantia de que será melhor do que um vinho cortado. Alguns dos melhores vinhos existentes no mundo são fruto da combinação de diferentes variedades (RIZZON *et al.*, 1996).

As uvas da variedade *Vitis vinífera* a partir das quais são obtidos os vinhos finos, são as cultivares que apresentam melhor qualidade para a vinificação dentre

as videiras européias e as quais ocupam a maior parte das áreas cultivadas com videiras no mundo. No entanto, seu cultivo está limitado a algumas regiões vitivinícolas brasileiras, em virtude dessas uvas serem cultivadas mais facilmente em climas secos, com baixa umidade relativa do ar e bastante insolação (KUHN *et al.*, 1996).

As uvas da variedade *Vitis labrusca* são cultivadas em grande escala, em todas as regiões vitícolas do país. São mais fáceis de cultivar dada a sua rusticidade e resistência às doenças e pragas, além de tolerarem melhor as condições de clima com alta umidade relativa. Os vinhos produzidos com essas uvas apresentam cheiro ou aroma pronunciado, o qual na enologia clássica se denomina “foxé” ou “foxado”, e é considerado um grande defeito do vinho. Entretanto, o consumidor brasileiro, habituado com o consumo desse tipo de vinho, muitas vezes considera essa característica como um atributo indispensável. Por exemplo, o vinho licoroso doce de Niágara elaborado em São Roque, São Paulo, caracterizado por esse aroma pronunciado, apresenta um número apreciável de consumidores (HASHIZUME, 2001).

As variedades de uvas da espécie *Vitis bouquina* são cultivadas especialmente em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul, representando aproximadamente 70% da produção mineira. Essas variedades são utilizadas na elaboração de vinhos de mesa de americanas e destilados.

As videiras híbridas são cultivares provenientes de cruzamentos, e que, de uma maneira geral apresentam maior resistência às moléstias e pragas do que as européias e qualidade um pouco superior à das americanas para vinificação (HASHIZUME, 2001).

A uva Itália, a qual é utilizada como matéria-prima nesse trabalho, é um exemplo do sucesso obtido pelo melhoramento genético da videira. Foi criada por Ângelo Piróvano, na Itália, através de hibridação entre duas castas de *Vitis vinifera* (Bicane X Moscatel de Hamburgo), realizada em 1911. Trata-se, portanto, de uma cultivar pertencente à espécie *Vitis vinifera*. Inicialmente, foi identificada como Piróvano 65 e mais tarde, em 1927, denominada Itália pelo próprio Piróvano. Adquiriu importância na viticultura para mesa em vários países, como na Itália, Romênia, França, Iugoslávia, Portugal, Venezuela, Brasil e outros. Foi introduzida no Brasil em 1920 e é atualmente a principal variedade de uva fina de mesa.

As uvas para fins industriais estão ordenadas de acordo com a sua aptidão/qualidade enológica (BRASIL, 2003), e distribuídas conforme a Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Grupos de uvas para fins industriais.

GRUPOS	TINTAS	BRANCAS
GRUPO I Viníferas Nobres	Cabernet Franc, Merlot, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Malbec, Gamay Beaujolais e Petite Sirah.	Chardonnay, Chenin Blanc, Gewurztraminer, Pinot Blanc Riesling itálico, Riesling Renano Sauvignon Blanc, Sylvaner, Flora, Muller Thurgau e Sémillon.
		Chasselas Doré, Malvasia Blanca, Prosecco, Tocay Friulano, Trebiano, Vernaccia, Aligoté, Clairette, Malvasia Amarela, Malvasia Di Cândia, Malvasia Verde, Moscato de Alexandria, Moscato Canelli, Moscato Giallo, Moscato Itália ou Piróvano 65, Palomino, Peverella, Verdea, Verdisso e Vermentino.
GRUPO II Viníferas Superiores	Barbera Piemonte, Barbera D’Asti, Carmenère, Canaiolo, Grenache, Marzamina, Nebbiolo, Sangiovese, Tannat, Aramon, Carignan, Calitor (Sira Falsa), Cinsaut, Bonarda, Freisa, Gamay St. Romain, Grand Noir e Lambrusco.	
GRUPO III Comum	Concord, Herbermont, Isabel, Seibel 2, Seibel 1077 (Couderc), Seibel 5455, Seibel 10096, Ives (Bordô, Folha de Figo), IAC 138- 22 (Máximo), Clinton, Jacquez, Landot 244 ou 304, Oberlin 595, Othello e Zeperina.	Baco Blanc, Courderc 13, IAC 116- 31 (Rainha), Niágara Branca, Niágara Rosada, Seyve Villard 5276 (Seyval), Seyve Villard 12375, Goethe, Martha e Seibel 13680.

FONTE: PORTARIA N° 270, 1988 (BRASIL, 2003).

Na Tabela 2.2 as uvas foram agrupadas de acordo com a espécie. As uvas apresentadas nessa tabela são as que apresentam importância econômica no mercado brasileiro.

Tabela 2.2 – Uvas importantes economicamente para o Brasil

ESPÉCIES	TINTAS	BRANCAS
<i>Vinífera</i>	Barbera, Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sangiovese, Canaiolo, Syra, Pinot-Noir, Malbec e Tannat.	Moscato (Giallo, Itália ou Piróvano 65), Pevrella, Trebbiano, Malvasia, Riesling Renano, Riesling Itálico, Sauvignon Blanc, Chardonnay; Gewürztraminer, Pinot-Blac, Semillon.
<i>labrusca</i>	Isabel, Concord, Tercy, Bordô (Yves), Folha de figo e York madeira.	Niágara branca e rosada.
<i>bourquina</i>	Hebermont, Jacques.	
<i>Híbridas</i>	Seibel 2, Seibel 10.096, Seibel 5455, Seibel 13680, IAC 138-22(Máximo), Pignoletta e Couderc 13.	Seyve Villard 5276, Seyve Villard 12375, IAC 116-31(Rainha), IAC 21-14(Madalena).

FONTE: PORTARIA N° 270, 1988 (BRASIL, 2003).

Com relação ao mercado nacional, sabe-se que pouco menos de 50% da produção de uvas é destinada ao processamento. O Rio Grande do Sul é o principal produtor de uvas para processamento, representando em torno de 95% do total de uvas processadas no país. A área cultivada com uvas no Brasil em 2003, segundo IBGE, foi de 68.323ha. (Tabela 2.3). O Rio Grande do Sul figura como o principal produtor, com área de 38.517ha, ou seja, 56,37 % da área total do país, seguido pelo Estado de São Paulo com 12.398ha (MELLO, 2005).

A produção de uvas no Brasil se localiza nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em atividade consolidada, com importância sócio-econômica, nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Pernambuco, Bahia, e Minas Gerais, com participação de 57,10%; 17,44%; 9,63%; 5,04%; 4,93%; 3,74% e 1,34%, da área colhida em 2000, respectivamente. No ano 2001, 44,14% da produção nacional de uva foi destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados, perfazendo um total de 469.098 toneladas de uvas (Tabela 2.4). Além dos Estados tradicionalmente produtores de uva, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (Região Centro-oeste) e Ceará (Região Nordeste) despontam como potenciais produtores de uvas de mesa (MELLO, 2003).

No Estado de São Paulo, destacam-se dois pólos vitícolas: um na Região Noroeste e outro na Região Leste. Na região Leste, a área de vinhedos é da ordem de 7.870 ha. Destaca-se num primeiro grupo, centrado nos municípios de Jundiaí, Vinhedo, Indaiatuba, Valinhos e Campinas, a produção de uva americana para mesa, representando cerca de 67% da área cultivada (5.270,2ha), com predomínio absoluto da cultivar Niágara Rosada. Num segundo pólo de produção, centrado no município de São Roque, estão as uvas destinadas à elaboração de vinho, representando aproximadamente 4% da área cultivada (335ha), todas americanas e híbridas, com destaque para a cultivar Seibel 2. No terceiro grupo, que tem por município pólo São Miguel Arcanjo, estão as uvas finas de mesa. Na Região Noroeste de São Paulo (centrada em Jales), a viticultura ocupa cerca de 1.212 hectares e está em fase de expansão. Nos últimos anos tem-se verificado um expressivo crescimento do plantio da cultivar Niágara Rosada, que vem se constituindo numa importante alternativa para diversificação da matriz produtiva vitícola da região. O nível tecnológico é alto, proporcionando colheitas da ordem de 40 t/hectare de uvas (MELLO, 2003).

Tabela 2.3 - Área plantada de videiras no Brasil, em hectares - 2002/2003

Estado\Ano	2002	2003
Rio Grande do Sul	36.668	38.517
São Paulo	12.152	12.368
Paraná	6.000	6.500
Santa Catarina	3.514	3.671
Pernambuco	3.365	3.423
Bahia	2.732	2.911
Minas Gerais	950	903
Brasil	65.381	68.323

Fonte: IBGE

A produção de uvas no Brasil nos anos de 1998 a 2002 é apresentada na Tabela 2.4. Em 2002 foram produzidas 1.120.574t de uvas, sendo 45,23% da produção nacional de uva foi destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados. O Estado do Rio grande do Sul, produziu 570.161 toneladas de uvas, São Paulo, 231.775 t, Pernambuco 99.978 t e Bahia 82.383 t.

Tabela 2.4 - Produção de uvas no Brasil, em toneladas – 1998/2002

Discriminação/Ano	1998	1999	2000	2001	2002
Uva para Vinho	348.523	469.870	549.306	469.098	506.799
Uva de Mesa	387.947	398.479	429.271	596.719	613.775
Total	736.470	868.349	978.577	1.062.817	1.120.574

Fonte: MELLO, 2003.

O hábito de beber vinhos foi trazido ao país pelos imigrantes europeus que o povoaram na época do Brasil Colônia. Porém, com o passar dos anos, o vinho passou a ser elaborado a partir de uvas americanas, as quais foram trazidas ao Brasil pela Princesa Isabel e possuíam uma maior resistência ao clima e as pragas, sendo considerado de baixa qualidade quando comparado aos vinhos elaborados a partir de uvas europeias (*vitis vinífera*). O vinho brasileiro continuou, quase que exclusivamente, sendo elaborado com uvas Isabel até o final da década de 60 quando se iniciou no Brasil a elaboração de vinhos com cultivares *vitis vinífera*, importadas da Europa.

Apesar do início do cultivo de *vitis vinífera* nos anos 60, ainda são os produtos derivados das variedades de uvas americanas e híbridas os principais protagonistas da cadeia produtiva. A comercialização de vinho de consumo corrente (vinho comum) apresenta um crescimento equilibrado ao longo do período 1997-2001, com taxas positivas que somam 26,4%. Este comportamento, em parte, está relacionado com o poder aquisitivo da população, pois, como se sabe, este tipo de vinho geralmente é comercializado a preços relativamente acessíveis. Outros aspectos, tais como a preferência pelas características de gosto e aroma "foxado" típico das variedades *V.labrusca*, a simpatia dos consumidores por produtos tipo "colonial", e a facilidade de encontrar os produtos mesmo nos locais mais remotos do país, também explicam, em parte, a estabilidade verificada neste mercado (MELLO, 2003).

Quanto ao consumo, a Tabela 2.5 apresenta uma síntese do mercado brasileiro. O consumo per capita/ano de vinhos situa-se em 1,81 litros, em 2001, que, comparando-se com países tradicionalmente vitivinícolas, é baixo. Além disso, a Tabela 2.5 mostra que o consumo de suco de uva aumentou significativamente nos últimos anos, passando de 0,15 L até 1995 para 0,48 L em 1998, situando-se

em 0,35 L em 2001. Já o consumo de uva de mesa foi de 3,42 kg per capita, em 2001.

Tabela 2.5 - Consumo per capita de vinhos, sucos e uvas, no Brasil 1995/2001

Produtos/anos	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Vinhos (L)	1,51	1,58	1,62	1,60	1,80	1,89	1,81
Suco de Uva (L)	0,22	0,24	0,25	0,48	0,38	0,33	0,35
Uvas de Mesa (Kg)	2,69	2,79	3,12	2,52	2,35	2,32	3,42
Uvas secas (Kg)	0,25	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09	0,10

Fonte: MELLO, 2003.

2.4 VINDIMA OU COLHEITA DA UVA

A obtenção de um bom vinho se deve, fundamentalmente, à escolha das uvas que oferecem boa maturação e ótimo estado sanitário. Não importa que as cascas sejam defeituosas ou tenham machas, o essencial diz respeito à excelência do suco e somente se rejeitam as uvas que apresentam podridão ou outro problema pertinente (MORETTO *et al.*, 1988).

Uma das preocupações iniciais para a elaboração de vinho consiste na fixação da data do início da vindima. Isso é muito importante, visto que se devem organizar e efetuar os preparativos para o recebimento das uvas. Essa fixação nem sempre é fácil de ser estabelecida, devido a inúmeros fatores. Entre esses fatores se destaca no Brasil as condições meteorológicas adversas (chuvas), durante a maturação, não permitindo que as uvas atinjam a maturação industrial desejada, obrigando que seja antecipada a vindima em virtude da podridão e conseqüentemente perda. As uvas nessas condições apresentam baixo teor de açúcar e alta acidez.

A colheita deve ser realizada quando a uva estiver perfeitamente madura, conforme a variedade e caso, já que para elaborar um vinho licoroso costuma se deixar a uva no pé mais tempo do que para a elaboração de um vinho de mesa seco. A maturação da uva não pode ser julgada pela vista nem pela degustação, mas sim por um mostímetro ou um refratômetro manual, isso evita que ocorra erros grosseiros e prejuízos. Apesar da análise de maturação da uva consistir principalmente na avaliação da concentração do açúcar no mosto, também é útil

observar a acidez e, no caso dos vinhos tintos, o teor de matérias corantes da uva (RIZZON *et al.*, 1996).

A observação prática nos diz que com o decorrer da maturação das uvas, estas vão perdendo a dureza primitiva (acidez) e ganhando em doçura (açúcar). Se um gráfico da concentração de açúcar e de ácidos a partir do começo da maturação fosse construído, verificar-se-ia se que a concentração de ácidos apresentaria uma curva com decaimento constante, ao passo que o teor de açúcar eleva-se gradativamente até ficar estacionário, mostrando o momento ideal para a vindima.

A análise do teor de açúcar da uva deve começar a ser feito de duas a três semanas antes da provável data do início da vindima. Essas análises devem ser realizadas em intervalos de 3 em 3 dias. As amostras das uvas devem ser apanhadas em lugares distintos do vinhedo, de modo que represente a média da variedade de uva a ser colhida. Esmagadas e bem espremidas as uvas, cõa-se o mosto por um pano grosseiro registrando-se os resultados analíticos. As uvas devem ser bem espremidas porque com o avanço da maturação, o açúcar se desloca para a periferia do bago (grão de uva). Devem realizar-se análises de tempos em tempos até o momento em que não se note aumento da concentração de açúcar entre a última e a antepenúltima análise (PATO, 1998).

Infelizmente, no Brasil, especialmente nas regiões vinícola do país (Sul, Sudeste), não é simplesmente a análise da concentração de açúcar que determina o início da vindima (colheita), pois essas regiões, no momento da colheita (janeiro e fevereiro), estão no período das chuvas. As chuvas favorecem o aparecimento de doenças (míldio, oídio, saraiva) e o ataque de insetos, por isso, geralmente, se efetua a colheita antes de se atingir o melhor grau de maturação. Este é o principal motivo para se permitir a “Chaptalização” no Brasil.

Além disso, a escassez de chuva também provoca problemas na fermentação dos mostos, pois devido a falta de chuvas as leveduras presentes nas uvas não apresentam uma alta vitalidade. Com isso os açúcares não são totalmente fermentados, fazendo com que vinhos ficam mais expostos ao desenvolvimento das bactérias e, portanto, suscetíveis a várias doenças, sobretudo, da volta (PATO, 1998).

A uva que não está madura oferece vinhos ásperos, azedos, e conseqüentemente de qualidade inferior aos obtidos pela mesma uva que sofreu uma completa maturação. Além disso, quando se utiliza uva completamente madura,

a mesma apresenta maior concentração de açúcar, o que proporciona uma economia no processo de “Chaptalização”.

Sob o aspecto sanitário é importante colher uvas sãs, o que é possível nos anos em que a maturação ocorre com tempo seco. Os anos chuvosos, além de atrasarem a maturação, favorecem a podridão do cacho. Esses dois fatores, maturação incompleta e podridão, são altamente prejudiciais à qualidade da uva para vinho. Além disso, deve se exigir que as uvas não estejam sujas de terra, lama ou com folhas de videiras misturadas, isso para evitar certos problemas, como, por exemplo, gostos impróprios no vinho.

A colheita deverá ser realizada, de preferência, com tempo seco e nas primeiras horas da manhã. Os cachos devem ser colhidos com cuidado e colocados em recipientes pequenos (cestos ou caixas plásticas), de modo que não fiquem machucados ou esmagados durante o transporte. O esmagamento ocasiona fenômenos de oxidação e maceração, que são prejudiciais à qualidade do futuro vinho. Além disso, as uvas colhidas não devem permanecer expostas ao sol por um longo período, para evitar que elas cheguem a vinícola com uma temperatura elevada.

Para obtenção de vinhos de qualidade, o transporte deverá ser realizado preferencialmente nas mesmas caixas em que as uvas foram coletadas. As uvas devem ser transportadas inteiras à vinícola, para que não se acelere podridão, e cobertas com lonas, a fim de abrigá-las da poeira, do sol e da chuva. Após o uso das caixas plásticas, essas devem ser lavadas e esterilizadas com água, na qual foi dissolvido um pouco de metabissulfito de potássio.

2.5 OBTENÇÃO E CORREÇÃO DO MOSTO

Neste momento é importante apresentar a definição do que é mosto. “Dá-se o nome de mosto ao caldo ou suco obtido das frutas, depois de espremidas, para a elaboração de vinhos ou fermentados” (MORETTO *et al.*, 1988).

A obtenção do mosto é uma operação até certo ponto simples, porém merece determinados cuidados para que não se obtenha um vinho de baixa qualidade. Essa operação é denominada esmagamento e tem por finalidade:

- Provocar o rompimento das bagas por compressão ou choque, dilacerando-as a fim de liberar o máximo de suco possível, sem, no entanto, gerar o esmagamento das sementes e dos engaços;

- Promover intensa aeração do mosto antes do início da fermentação, para tornar o mosto bastante favorável ao desenvolvimento das leveduras;
- Permitir uma boa maceração do conjunto do mosto (líquido e sólido), em particular na vinificação em tinto, possibilitando uma boa dissolução das matérias corantes e de taninos contidas nas cascas dilaceradas, o que torna os vinhos mais tintos.

Existem vários tipos de esmagadeiras mecânicas, mas quase todas são baseadas em dois tipos: Esmagadeira de Cilindros e Esmagadeira Centrifuga.

Antes do esmagamento as uvas devem passar por um processo de desengaço, que tem por objetivo separar o engaço dos grãos de uva, visto que o engaço pode conferir características indesejáveis ao vinho, por exemplo, deixando o vinho adstringente e ácido. As desengaçadeiras realizam com perfeição essa separação do engaço, por isso normalmente as esmagadeiras mecânicas possuem acopladas a elas uma desengaçadeira, sendo essas máquinas denominadas de esmagadeira-desengaçadeira.

Após a obtenção do mosto geralmente são necessárias algumas correções, principalmente para corrigir a insuficiência da maturação da uva, sendo algumas práticas permitidas pela legislação brasileira. Dentre as correções permitidas destaca-se a correção da concentração de açúcar do mosto com adição de sacarose ou com mosto concentrado (pouco usado no Brasil), além da acidificação do mosto por meio do ácido tartárico. Por outro lado, quando o mosto acusa elevada acidez é permitido efetuar-se a desacidificação.

Uma chaptalização moderada, que permite elevar o teor alcoólico de 1° a 1,5°GL, confere ao vinho uma melhoria de qualidade, aumentando o seu corpo e tornando-o mais “redondo” ao paladar. Contudo, a realidade brasileira muitas vezes obriga à correções de açúcar em proporções maiores, ocasionando um desequilíbrio do vinho sob o ponto de vista degustativo.

A dissolução do açúcar deve ser efetuada antes da adição ao mosto. Nunca adicionar o açúcar diretamente ao mosto, pois será de difícil solubilização e certamente uma parte irá depositar-se no fundo do recipiente. A dissolução do açúcar é facilmente realizada no mosto quente, ou seja, quando se encontra na fase de fermentação. A chaptalização deve ser feita no início da fermentação, no momento em que a massa começa a esquentar e quando o “chapéu” de bagaço se

forma. Recomenda-se chaptalizar em uma única vez, antes que a metade dos açúcares presentes no mosto sejam transformados. O açúcar adicionado tardiamente favorece a fermentação malolática, a qual poderá ocasionar uma doença láctica, antes mesmo que as leveduras transformem todo o açúcar adicionado (HASHIZUME, 2001).

Já o processo de acidificação é utilizado em mostos deficientes em acidez. Normalmente emprega-se o ácido tartárico, e essa prática é denominada de tartagem. A acidificação do mosto com ácido cítrico deve ser efetuada com restrição, pois o ácido cítrico é facilmente decomposto pelas bactérias da fermentação malolática, o que ocasiona a elevação da acidez volátil e conseqüentemente depreciação do produto final. Na prática, recomenda-se a correção com ácido cítrico no vinho final já elaborado.

Outra correção que pode ser necessária é a desacidificação, embora a fermentação alcoólica normalmente provoca a diminuição da acidez do mosto. Uma desacidificação biológica mais marcante pode ser obtida pela ação de leveduras específicas, as *Schizosaccharomyces*, as quais transformam o ácido málico em álcool etílico e gás carbônico. Porém, isso ocorre em condições especiais de tratamento da uva (maceração carbônica) e também sob a ação das bactérias lácticas (fermentação malolática), as quais transformam o ácido málico em ácido láctico e gás carbônico, desacidificando o mosto. Já quando uma desacidificação drástica é necessária, utiliza-se a desacidificação química, a qual emprega especialmente o carbonato de cálcio.

2.6 MICROBIOLOGIA DO VINHO

2.6.1 LEVEDURAS

As leveduras são os agentes da fermentação alcoólica. Existe um grande número de espécies de leveduras que se diferenciam por seu aspecto, suas propriedades, sua forma de reprodução e também pela maneira de transformar o açúcar (HASHIZUME, 2001).

Os vinicultores utilizam as leveduras para a produção de etanol, os padeiros para a produção de dióxido de carbono, e os cervejeiros para a produção de ambas as substâncias. A maioria das leveduras importantes para a produção de vinho, sidra, saquê e cerveja são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, ainda que outras

espécies possam atuar. Muitas cervejas amargas, por exemplo, são feitas usando a *S. carlsbergensis* (RAVEN, 2001).

Apesar de muitos microrganismos (leveduras, bactérias e fungos filamentosos) contribuírem para a produção e composição do vinho, as leveduras têm a principal influência por serem elas as condutoras da fermentação alcoólica (FLEET, 1993). Os microrganismos afetam a qualidade da uva antes da safra e durante a fermentação, eles metabolizam os açúcares e os outros componentes em etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos secundários que coletivamente contribuem para a sutileza e individualidade das características do vinho (FLEET, 2003).

Uma levedura, por definição, é um fungo unicelular que se reproduz principalmente assexuadamente por brotamento, porém existem algumas espécies que se reproduzem por cissiparidade (fissão). Além dessas duas formas assexuadas de reprodução, as leveduras também têm reprodução sexuada principalmente através da produção de ascósporos. Muitos fungos exibem crescimento unicelular e filamentosos, alternando uma forma ou outra de acordo com as condições ambientais. Em muitos desses fungos, a forma filamentosa é a fase na qual ele passa a maior parte de seu ciclo de vida. Outros, no entanto, permanecem como leveduras, tal como a conhecida *Saccharomyces cerevisiae*. Embora se saiba á algum tempo que a *S. cerevisiae* exibe uma fase filamentosa, apenas recentemente descobriu-se que a mudança de levedura para filamento é iniciada por um nível baixo de nitrogênio disponível. Geralmente, cultivos em laboratório fornecem todos os nutrientes essenciais para que a *S. cerevisiae* continue a existir como levedura. Aparentemente, a fase filamentosa da *S. cerevisiae* é um recurso para procurar alimento em ambientes onde o mesmo é escasso (RAVEN, 2001).

As leveduras não são um grupo taxonômico formal. O crescimento leveduriforme é exibido por grande número de fungos não relacionados entre si, englobando os *Zygomycotya*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*. Há pelo menos 80 gêneros de leveduras com aproximadamente 600 espécies conhecidas, sendo a maioria e as mais importantes para a indústria de bebidas alcoólicas pertencente ao filo *Ascomycota* (RAVEN, 2001). Além disso, o diâmetro de cada célula pode variar de 2 a 10 micras, dependendo da espécie (HASHIZUME, 2001).

A forma mais comum de reprodução nas leveduras é o brotamento, isto é, a produção de pequenas protuberâncias, o broto, a partir da célula mãe. Cada célula

da levedura pode ser considerada como uma célula conidiogênica. O brotamento é, de fato, um método de reprodução assexuada. Muitas leveduras multiplicam-se assexuadamente somente na condição haplóide. Cada célula haplóide é capaz de servir como gameta e, em certo momento, duas células haplóides podem fundir-se formando uma célula diplóide, ou zigoto, o qual funciona como um asco. Não há fase dicariótica nas leveduras.

A multiplicação por brotamento não necessita mais que 10 a 15 minutos, e uma única célula de levedura pode dar origem a alguns milhões de indivíduos em 24 horas (HASHIZUME, 2001). Células de *S. cerevisiae* em brotamento estão ilustradas na Figura 2.1.

Já a reprodução assexuada por cissiparidade semelhante à que ocorre nas bactérias, é observada nas leveduras pertencentes à ordem das *Schizosaccharomycetales*, tendo como exemplo a *Schizosaccharomyces octosporus* e a *Schizosaccharomyces pompe*. É importante frisar que as *Saccharomyces cerevisiae* pertencem à ordem das *Saccharomycetales*, sendo essas pertencentes ao do filo *Ascomycota* do reino *Fungi* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Sabe-se que existem cerca de doze gêneros de leveduras de vinho, cada um dividido em espécies. As leveduras encontradas na vinificação podem apresentar uma das quatro formas seguintes: elíptica ou oval; alongada, em forma de salsicha; e apiculada, alongada em suas extremidades, como limão (HASHIZUME, 2001). Quando o meio não é favorável à vida da levedura (temperatura muito baixa ou muito elevada, ausência de açúcares, porcentagem insuficiente de água e outros elementos), ela se organiza em uma forma de resistência, a membrana se espessa e o protoplasma forma certo número de glóbulos ou esporos (de 2 a 4), que são envolvidos por membranas. Nesse estágio, diz-se que a levedura está esporulada ou no estado de vida latente. Colocadas em meios favoráveis, a uma temperatura de 25°C, a membrana espessa das leveduras esporuladas se rompe. Os esporos liberados se intumescem e iniciam o brotamento, dando origem a novas células (RAVEN, 2001).

Deve-se salientar que as leveduras encontram-se na superfície da uva madura no momento da vindima e são transportadas para a cuba ou os recipientes de vinificação; uma outra parte prolifera nas cubas. No solo, seu habitat de inverno, encontram-se nas camadas superficiais. Durante o período de verão são transportadas para a superfície das uvas pela poeira e sobretudo pelos insetos,

onde ficam aderidas em uma cera denominada pruína, a qual recobre as cascas das bagas.



Figura 2.1 – Reprodução assexuada por brotamento da *Saccharomyces cerevisiae*, observado com um aumento de 400 vezes

2.6.2 SUCESSÃO DE ESPÉCIES DE LEVEDURA DURANTE A VINIFICAÇÃO

As várias espécies de levedura existentes na uva não se encontram em na mesma proporção. Além disso, sua maior ou menor resistência ao álcool e também ao anidrido sulfuroso são os principais determinantes na proporção na qual elas se encontram no mosto, durante as várias fases do fenômeno fermentativo (PATO, 1998).

As leveduras apiculadas, como *Kloeckera apiculata* ou *Hanseniaspora uvarum*, são geralmente responsáveis pelo início e primeira fase da fermentação alcoólica até aproximadamente 4°GL a 5°GL, visto que se encontram na uva no estado ativo. Nas uvas em podridão, a fermentação pode ser iniciada pela *Torulopsis bacillaris*, capaz de produzir álcool de 7°GL a 10°GL. Entretanto, pouco resistente a anidro sulfuroso, sua participação é reduzida no mosto sulfitado (HASHIZUME, 2001).

As *Saccharomyces* invadem o meio muito rapidamente e nesse momento as leveduras iniciais desaparecem. Já entre as *Saccharomyces*, o poder alcoogênico varia de 8°GL a 18°GL. Na fase final de uma fermentação, as espécies dominantes são *Saccharomyces ellipsoideus* e *Saccharomyces bayanus*, sendo está última a mais alcoogênica e denominada “acabadora” de vinhos de graduações alcoólicas elevadas.

Essa sucessão de leveduras tem grande importância para o vinicultor, visto que diferentes espécies e variedades de leveduras consomem diferentes quantidades de açúcares para produzirem a mesma quantidade de álcool. Assim, enquanto umas geram 1°GL consumindo 22g de açúcar (caso das *Kloeckera apiculata*) certas leveduras produzem a mesma quantidade de álcool consumindo 20g de açúcar. Entretanto outras, em particular a *Saccharomyces ellipsoideus*, não necessitam de mais de 17g de açúcar para gerar 1°GL. Graças a uma feliz coincidência da natureza, as *Saccharomyces ellipsoideus* suportam fortes doses de anidrido sulfuroso e meios muito ácidos, o que possibilita a seleção nos mostos apenas das leveduras mais eficientes (HASHIZUME, 2001).

2.6.3 LEVEDURAS DE CONTAMINAÇÃO

Normalmente, elas se encontram sobre materiais de vinificação e dentro de recipientes vinários (HASHIZUME, 2001).

Grande número de espécies de leveduras de contaminação está presente nas adegas de conservação. As micodermas são leveduras oxidativas que formam a “flor” na superfície do vinho e são particularmente abundantes. Entre as leveduras formadoras de “véu” na superfície do vinho, ou sobre as paredes embebidas de vinho e em contato com o ar atmosférico, encontra-se a espécie *Candida mycoderma*, normalmente acompanhada de *Pichia* ou de *Bretanomyces*. Para evitar esse tipo de levedura, deve-se efetuar o atesto do recipiente periodicamente, isto é manter sempre cheio o recipiente vinário ou, em outras palavras, evitar espaços vazios (HASHIZUME, 2001).

2.6.4 EMPREGO DE LEVEDURA NA VINIFICAÇÃO

As uvas maduras são portadoras de inúmeros microrganismos (fermentos) desejáveis e indesejáveis: vários tipos de leveduras alcoólicas, fungos e bactérias. No mosto incubado esses microrganismos acham-se misturados, e o desenvolvimento de cada um está condicionado a certos fatores, como a constituição do mosto, a temperatura e aeração.

A sulfitação tem por objetivo inibir o desenvolvimento dos microrganismos existentes no mosto, em particular os indesejáveis. Entretanto, esses microrganismos não são destruídos, permanecendo no estado latente, o que

possibilita a inoculação do mosto com leveduras selecionadas ou desejadas em plena atividade, as quais dominam rapidamente as selvagens (HASHIZUME, 2001).

A inoculação do mosto com a levedura adequada é sempre importante na vinificação, e pode ser feita a partir de leveduras selvagens ou naturais, provindas de uvas sadias. Todavia, convém salientar duas objeções ao emprego dessa prática: a falha na seleção de leveduras e a dificuldade de operação.

Algumas leveduras ditas selecionadas nem sempre são realmente selecionadas. Se elas são simplesmente cultivadas, isoladas em uma determinada região e posteriormente designada a sua origem, isto não certifica que elas apresentem vantagens para a produção de vinho. Isso não basta para garantir o seu valor. Selecionar significa escolher entre um número considerável, após um estudo de suas características fisiológicas: rendimento em álcool, poder alcoogênico, resistência à temperaturas elevadas, grande produtora de glicerol ou pequena de ácido acético, produção de aroma particular, degradadora de ácido málico e outros (HASHIZUME, 2001).

Para que seja eficaz, a inoculação de levedura deve ser efetuada no meio previamente preparado com sulfitação, como será mencionado posteriormente. Esse resultado não é fácil de obter, pois não é possível esterilizar o mosto, e as leveduras naturais melhores adaptadas podem se tornar predominantes em lugar das inoculadas.

As vantagens do emprego de leveduras selecionadas, quando bem realizado, podem ser resumidas como se segue:

- Fermentação mais rápida no início, principalmente nas primeiras cubas;
- Fermentação mais regular e sua conclusão sempre mais rápida;
- Rendimento melhor na produção de álcool, com um aumento de cerca de 0,2°GL a 0,3°GL;
- Boa conservação dos vinhos, sendo bem secos, isto é, isento de açúcares redutores fermentescíveis.

2.6.4.1 Pé-de-cuba a partir de leveduras naturais da uva

O pé-de-cuba nada mais é do que uma fração de mosto em plena fermentação (3 a 10% do volume total a ser fermentado), que deve ser adicionada ao volume total do mosto para facilitar o início da fermentação e garantir que esta ocorra predominantemente com as leveduras selecionadas (RIZZON *et al.*, 1996).

Na falta de leveduras selecionadas industrialmente nos laboratórios, pode se fazer bons fermentos utilizando somente as leveduras selvagens, existentes nas próprias uvas.

Três a quatro dias antes do início da vindima, deve-se colher cerca de 1200 a 1500Kg de uvas maduras e sadias (isentas de podridão) e após o esmagamento e desengaçamento, colocar, numa barrica sem tampa ou numa cuba cerca de 100 litros do mosto com casca, adicionando-se em seguida de 20 a 30g de metabissulfito de potássio e deixar fermentar espontaneamente. O restante da uva esmagada e desengaçada é esgotado e prensado, e o mosto obtido é sulfitado com 40 a 50g de metabissulfito por hL. Esse mosto sulfitado servirá para alimentar o mosto inicial, quando estiver em plena fermentação. A adição de mosto sulfitado deve ser efetuada em pequenas quantidades, para que não interrompa a fermentação. Dessa forma, no fim de 3 a 4 dias, 1000 a 1200L de mosto em fermentação servirão para inocular as duas primeiras cubas, à razão de 5 a 6hL por cuba de 200hL (cerca de 3%).

Em geral, depois que as primeiras cubas iniciam a fermentação, retira-se delas uma parte do mosto em plena fermentação para inocular as seguintes, e assim sucessivamente (HASHIZUME, 2001).

2.6.4.2 Pé-de-cuba a partir de leveduras selecionadas inativas

Leveduras selecionadas especialmente para produção de vinho, estão disponíveis no mercado, secas ou em placas de gelatina, no estado inativo. As seguintes operações devem ser seguidas para a preparação de pé-de-cuba a partir de cultura pura de levedura selecionada inativas para vinhos: 1°) Esterilizar cerca de 250 mL de mosto de suco de uva fresco, aquecido até a ebulição e colocar o suco numa garrafa previamente esterilizada (escaldada com água quente e vedada com tampão de algodão; 2°) Colocar o suco esterilizado em um tubo de ensaio contendo a cultura de levedura com meio sólido, até $\frac{3}{4}$ da capacidade e recolocar o tampão de algodão. Deixar uma noite à temperatura ambiente ou ao redor de 25°C. Transferir para a garrafa contendo o suco esterilizado e agitar. Deixar em temperatura em torno de 25 a 30°C. Agitar a garrafa de tempo em tempo para aerar do mosto; 3°) Preparar, em seguida, suco esterilizado em um balão de vidro de 20L, da seguinte forma: aquecer até a ebulição cerca de 15 a 16 litros de suco de uva em recipiente de aço inoxidável ou alumínio e colocar no balão de 20 litros, tampar com tampão de

algodão e deixar durante 24 horas ou até esfriar a 30°C; 4°) Quando o suco da garrafa estiver em fermentação ativa, por 3 a 4 dias verter no balão de 20 litros. Agitar o balão várias vezes ao dia para arejar o suco. Manter a boca do garrafão com tampão de algodão. Após cerca de 4 a 5 dias, o suco estará em plena atividade fermentativa; 5°) Quando o suco do balão de 20 litros estiver em plena atividade preparar cerca de 200 litros de mosto sem casca, com adição de 100 a 125 mg/L de SO₂, ou 200 a 250 mg/L de metabissulfito de potássio, preparado cerca de 3 a 4 horas antes da adição do suco do balão; 6°) Em 2 a 3 dias o mosto estará em plena fermentação, constituindo assim o pé-de-cuba, pronto para ser inoculado. Recomenda-se inocular cerca de 3 a 4% de pé-de-cuba no mosto a fermentar. O mosto que vai ser inoculado com o pé-de-cuba deverá ser sulfitado pelo menos 3 horas antes (HASHIZUME, 2001).

2.6.4.3 Inoculação com levedura selecionada seca e ativa

Por volta de 1980, iniciou-se a comercialização de levedura selecionada seca e ativa para fins enológicos. A partir de então, seu emprego tem crescido rapidamente nos países vitivinícolas. Sua adoção e difusão deve-se ao fato de ser prática, segura e cômoda, além de não necessitar período de regeneração e propagação das células, bastando uma simples reidratação por 15 a 20 minutos em água morna ou em mosto morno de 38 a 40°C (HASHIZUME, 2001).

A dose recomendada varia de 10 a 20 g por hL de mosto, dependendo da cepa de levedura e do tipo de vinho a produzir.

Existe, no comércio, uma gama apreciável de cepas de leveduras, cada qual apropriada para a elaboração de determinado tipo de vinho.

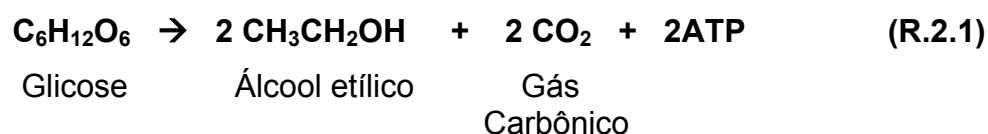
Elas são selecionadas e testadas em centros de pesquisas enológicas renomados e reconhecidos mundialmente, antes de serem comercializadas.

Essas cepas são selecionadas seguindo critérios enológicos, tais como: alto poder fermentativo, baixa produção de espuma; alta tolerância a álcool e SO₂; capacidade fermentativa a baixa temperatura, sem alterar os aromas primários de uva, portador de fator “killer”, que elimina leveduras selvagens indesejáveis; baixo produtor de H₂S (HASHIZUME, 2001).

A maioria das cepas comercializada é das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*.

2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

No processo de fermentação alcoólica de açúcares, os principais produtos são o álcool etílico e o gás carbônico. Esse fenômeno é representado esquematicamente pela Equação de Gay-Lussac (Reação R.2.1). Porém, deve-se deixar claro que a formação do etanol pela fermentação alcoólica é consequência de um complexo fenômeno no qual estão envolvidas sucessivas reações, esquematizadas na Figura 2.3 (HASHIZUME, 2001).



Apesar da simples esquematização, a transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO₂, envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo portanto nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (Figura 2.3). Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns promotores outros repressões da ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (LIMA *et al.*, 2001).

Convém ressaltar que a levedura *Saccharomyces* é um aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais metabolizados do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose, processo denominado de fermentação alcoólica. Porém o objetivo da levedura em fazer a fermentação alcoólica é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses necessários à manutenção da vida (LIMA *et al.*, 2001).

O mosto da uva no início da fermentação apresenta proporções iguais de glicose e frutose, mas durante o processo de fermentação alcoólica com a espécie de levedura comumente empregada, *Saccharomyces ellipsoideus*, a glicose é

fermentada mais rapidamente e a relação glicose/frutose decresce durante o processo. Admitindo-se que 1 mol de glicose fermentado é convertido em 2 mols de etanol e 2 mols de gás carbônico, pode se dizer que o rendimento na produção de álcool etílico é da ordem de 51,1% em massa do açúcar transformado. No entanto, na prática, mesmo em condições experimentais bem controladas, o rendimento mais elevado não ultrapassa os 48% e, no processo industrial, o rendimento é ainda menor (HASHIZUME, 2001).

Além disso, sabe-se que a fermentação alcoólica é uma reação exotérmica, isto é, desprende calor. Por isso, na prática, verifica-se um aumento de temperatura da ordem de 10°C a 15°C durante a fermentação. Portanto, se a uva chega à vinícola com uma temperatura já elevada como 30°C, seu mosto quando em fermentação atingirá rapidamente 40°C ou mais, temperatura muito prejudicial à levedura. Daí a necessidade de resfriar o mosto em fermentação e de se colher as uvas nas primeiras horas da manhã e não deixá-las expostas ao sol (HASHIZUME, 2001).

A aeração é necessária para a multiplicação de leveduras. Normalmente, os processos de esmagamento e desengaçamento de uva seguido do bombeamento do mosto para a cuba de fermentação exercem a aeração necessária. As leveduras se multiplicam vigorosamente no mosto até que a maior parte do oxigênio dissolvido seja consumido e então passam a fermentar os açúcares. A aeração é geralmente utilizada por certo período depois de ter se formado uma camada de bagaço e espuma na superfície do meio em fermentação. Essa operação é denominada remontagem (HASHIZUME, 2001).

A remontagem consiste em escorrer o mosto em fermentação através da torneira, situada na parte inferior da cuba, dentro de uma tina ou recipiente semelhante, deixando cair de uma certa altura. A pressão da queda produz uma emulsão que facilita a dissolução do oxigênio do ar no mosto. Recomenda-se ainda que o mosto escorra ao longo de uma prancha para aumentar a superfície de contato com o ar. O mosto arejado é então recirculado através de bomba para parte superior da cuba, sobre a camada de material composto por bagaço e espuma, que se acumula próximo à superfície do meio (conhecido como chapéu), estabelecendo assim um circuito de recirculação. A duração da remontagem é calculada em relação ao volume da cuba a ser remontada. Admite-se que a remontagem, ou seja, a recirculação de um terço ou metade do volume do mosto da cuba seja o suficiente.

A remontagem, além de fornecer oxigênio à levedura, apresenta outros efeitos como: a) homogeneizar as diferentes zonas da cuba em fermentação, uniformizando o teor de açúcar e a temperatura, muito irregulares nas diferentes partes da cuba, principalmente no início da fermentação; b) distribuir as leveduras em toda a massa; c) intensificar a maceração e, em conseqüência, extrair melhor o suco intersticial da casca, e solubilizar as matérias corantes (antocianinas) e taninos (HASHIZUME, 2001).

Além dos fatores apresentados, para se obter uma boa fermentação, o mosto deve conter os nutrientes requeridos pelas leveduras em quantidade suficiente. Entre as principais substâncias nutritivas indispensáveis para as leveduras de vinificação, as substâncias nitrogenadas têm a maior importância. Para suprir eventuais deficiências dessas substâncias nos mostos, costuma-se utilizar fosfato de amônio. Caracteriza-se um mosto deficiente em nitrogênio amoniacal quando seu teor se encontra abaixo de 25mg/L. A adição de 50 a 100mg/L de fosfato ou sulfato de amônio deve ser efetuada de preferência antes do início da fermentação (HASHIZUME, 2001).

2.7 INFLUÊNCIA DOS AGENTES FISICOS E QUIMICOS SOBRE A FERMENTAÇÃO

Este tópico discute o comportamento de uma fermentação vínica diante da ação de agentes como a temperatura, o pH, o álcool, o gás carbônico, o oxigênio e o anidrido sulfuroso.

2.7.1 TEMPERATURA

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam no crescimento e sobrevivência dos organismos. Temperaturas muito baixas dificultam o crescimento, pois desaceleram os processos vitais da célula, porém temperaturas muito elevadas também são um problema, pois provocam a desnaturação térmica das proteínas, em especial das enzimas (PATO, 1998).

A temperatura de fermentação é extremamente importante: baixas temperaturas permitem obter alto rendimento em álcool, não só pela fermentação mais completa, mas também por minimizar a perda por evaporação. A temperatura também afeta a velocidade da fermentação e a natureza e as quantidades de compostos secundários formados (HASHIZUME, 2001).

A temperatura ótima para a fermentação na maioria de leveduras para vinho é de 25°C a 30°C, embora existam leveduras que atuam a baixas temperaturas, ao redor de 10°C. Para os vinhos brancos a fermentação deve ser lenta, mantendo-se uma temperatura entre 18 a 20°C. Para os tintos, as temperaturas na fase de contato com a casca (maceração) devem ser mais elevadas, entre 20 e 26°C, o que facilita a extração de compostos fenólicos, responsáveis pela cor e estrutura destes vinhos. Quando não se dispõe de sistema de refrigeração, o uso da remontagem com arejamento do mosto é uma excelente forma de diminuir as elevadas temperaturas ocasionadas pelo processo de fermentação (RIZZON *et al.*, 1996).

Deste modo, as fermentações vínicas são classificadas de acordo com a faixa de temperatura em:

- Ótimas de 20 a 25°C;
- Normais de 25 a 30°C;
- Perigosas acima de 33°C.

Abaixo de 20°C a fermentação se dá lentamente, as leveduras trabalham com dificuldade e produzem menos álcool. Porém, quando a temperatura está acima de 33°C se desenvolvem predominantemente microrganismos indesejáveis, em especial, a bactéria da azedia (*Acetobacter*), a qual só se desenvolve bem acima de 33°C.

Deve-se ressaltar que baixas temperaturas favorecem a concentração de aromas e do álcool que estão sendo formados ao contrário das altas, que dificultam a ação das leveduras. Os bons vinhos são perfumados e desconhecem temperaturas superiores a 28°C. Contudo entre 30 e 35°C se encontra a temperatura ótima para o desenvolvimento da espécie *ellipsoideus*. Porém, pelas razões apontadas, não se deve permitir que a temperatura do mosto em fermentação ultrapasse os 32°C.

2.7.2 pH

O pH do meio onde crescem os microrganismos é um importante fator que influi tanto no crescimento quanto nos processos enzimáticos, dada a dependência existente entre a atividade enzimática e o pH. Desta forma, alterando-se o pH a ação de algumas enzimas é favorecida enquanto que a ação de outras é reprimida (LIMA *et al.*, 2001).

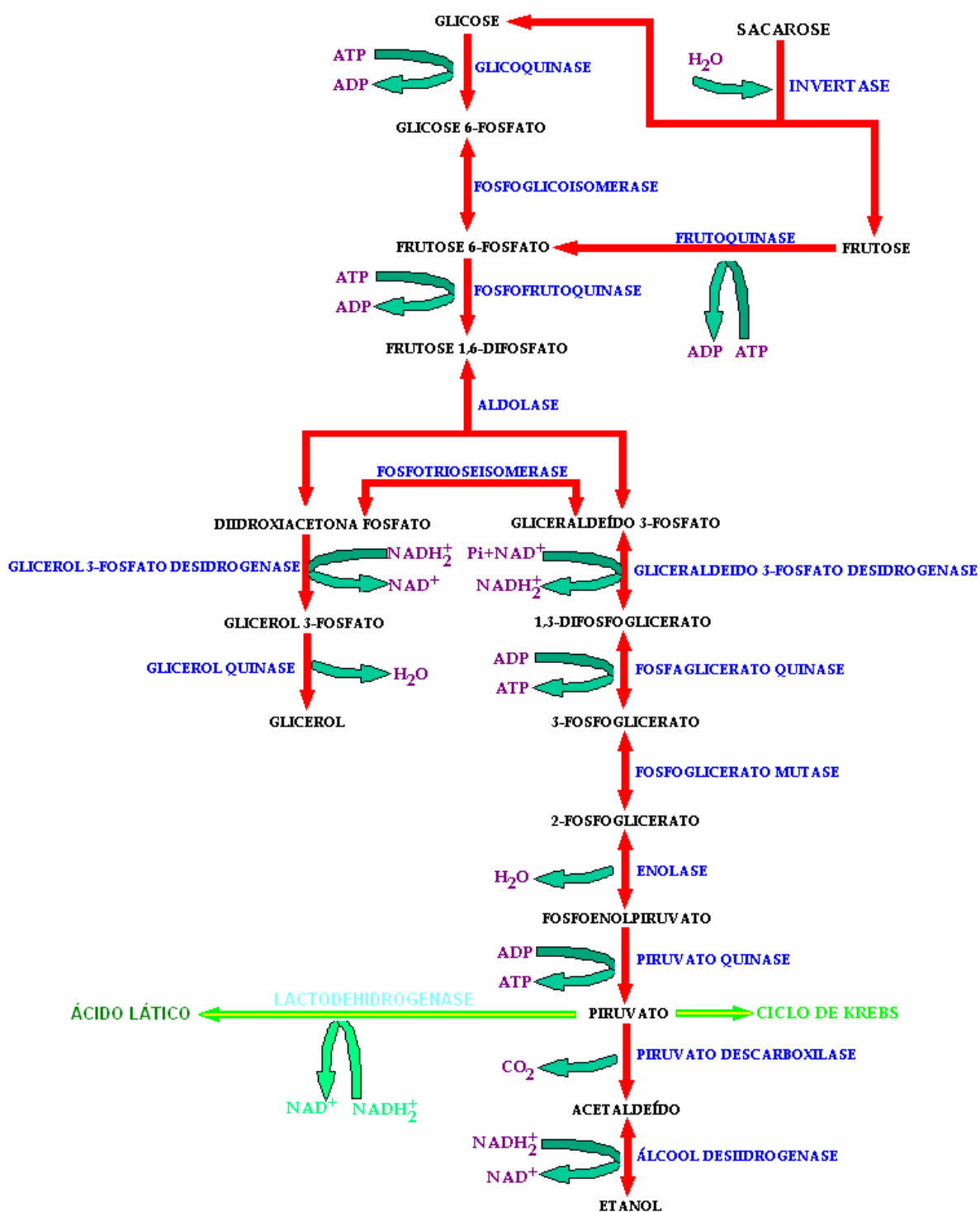


Figura 2.3 – Seqüência de reações para a formação de etanol e glicérol, conduzida por *Saccharomyces*.

O conhecimento do valor do pH do vinho para o enólogo é de suma importância, visto que é o pH protege o vinho da contaminação de microorganismos indesejados no momento da fermentação. Isso se deve ao fato de certas bactérias não suportarem um meio ácido, ao contrário das leveduras, principalmente da espécie *ellipsoideus*. Além disso, sabe-se que um vinho com pH inferior a 3,4 apresenta uma notável resistência ao ataque de bactérias, principalmente as da volta. Já um vinho com pH superior a 3,6 pode permitir o desenvolvimento da flora microbiana prejudicial (PATO, 1998).

Assim, um pH baixo favorece o mosto nos seguintes aspectos:

- na fermentação, por se opor ao desenvolvimento das bactérias lácticas,
- na própria seleção das leveduras;
- na ação da sulfitação, pois uma maior concentração de SO₂ estará presente na forma livre, o que aumenta sua atuação como anti-séptico e antioxidante.

Já nos vinhos, o conhecimento e a correção do pH não são menos importantes. Portanto, estando o pH igual ou abaixo de 3,3 o vinho é favorecido nos seguintes aspectos:

- limpam mais facilmente;
- são mais brilhantes;
- são mais resistentes à ação das bactérias, e
- facilitam os tratamentos complementares para a remoção de proteína e substâncias coloidais, realizadas através da adição de betonita.

2.7.3 ÁLCOOL

O álcool tem sido empregado desde a antiguidade como anti-séptico. Essa ação se deve ao fato do álcool desnaturar proteínas e dissolver lipídios. Assim, no decorrer da fermentação a eficiência do álcool como anti-séptico aumenta gradativamente, fazendo com que a fermentação ocorra com extrema dificuldade quando a sua graduação ultrapassa os 14°GL (PATO, 1998).

2.7.4 GÁS CARBÔNICO

O gás carbônico em grande quantidade e sob elevada pressão, especialmente, dificulta o trabalho das leveduras. Nos frisantes e espumantes naturais ele, em parte, serve de proteção contra possíveis fermentações do açúcar que em geral eles contêm. Nas fermentações o gás carbônico formado se assenta sobre o líquido nos depósitos ou tonéis, por isso se recomenda que esses lugares não fiquem totalmente cheios, pois o gás carbônico protege o mosto contra o desenvolvimento dos microrganismos que provocam a azedia (PATO, 1998).

2.7.5 OXIGÊNIO

Como se viu anteriormente, as leveduras são seres vivos e semelhantemente aos seres superiores se alimentam e se reproduzem. Para se reproduzirem elas carecem de uma alta quantidade de energia, a qual é obtida através da respiração. Quando ocorre a respiração o piruvato segue a seqüência de reações do Ciclo de Krebs, esquematizado na Figura 2.4, sendo totalmente convertido em CO₂ e energia.

Assim quanto mais oxigênio fornecido, mais intensa é a reprodução e menor é a produção de etanol. Conclui-se, portanto, que as massas devem ser bem arejadas no início da fermentação, para que as leveduras despertem mais rapidamente e se multipliquem à vontade, mas, no decorrer das fermentações, deve-se evitar os arejamentos para que elas sejam obrigadas a transformar o açúcar em benefício da riqueza alcoólica, ou seja, trabalhem para o vinicultor (PATO, 1998).

2.7.6 ANIDRIDO SULFUROSO

O anidrido sulfuroso (SO₂) é muito empregado na enologia, sendo seu uso conhecido na prática como sulfitação. Ele pode ser obtido diretamente queimando-se o enxofre ou uma mecha de enxofre, mas também pode ser obtido pela dissolução do metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅) ou pelo uso direto do SO₂ puro, o qual é comercializado liquefeito à pressão de 5 ou 6 kgf/cm² em cilindro de aço contendo de 25 a 100kg de SO₂. O SO₂ não é propriamente um produto inofensivo à saúde, mas até que a ciência encontre um substituto, tão eficaz e menos prejudicial, continuará a ser um mal necessário nas operações da viticultura (PATO, 1998).

Por uma feliz coincidência da natureza as *Saccharomyces ellipsoideus* resistem a fortes doses de SO₂, ao passo que as outras leveduras o toleram em

pequenas quantidades. Além disso, a grande maioria das bactérias, em especial a que provoca a azedia, não se desenvolve em meios sulfitados.

A ação antimicrobiana do SO_2 deve-se ao fato dele alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática das células bacterianas e sua eficácia depende do pH, pois o anidrido sulfuroso (SO_2) se combina com a água ($\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$), e quanto mais baixo o pH, mais alta é a proporção de SO_2 . Isso é importante, pois o SO_2 possui efeito antimicrobiano mais elevado do que o SO_3^{2-} . Assim, 3g/hL são eficazes no mosto com pH 3, mas são necessários 10g/hL a pH 3,5 e 20g/hL a pH 3,8 (HASHIZUME, 2001).

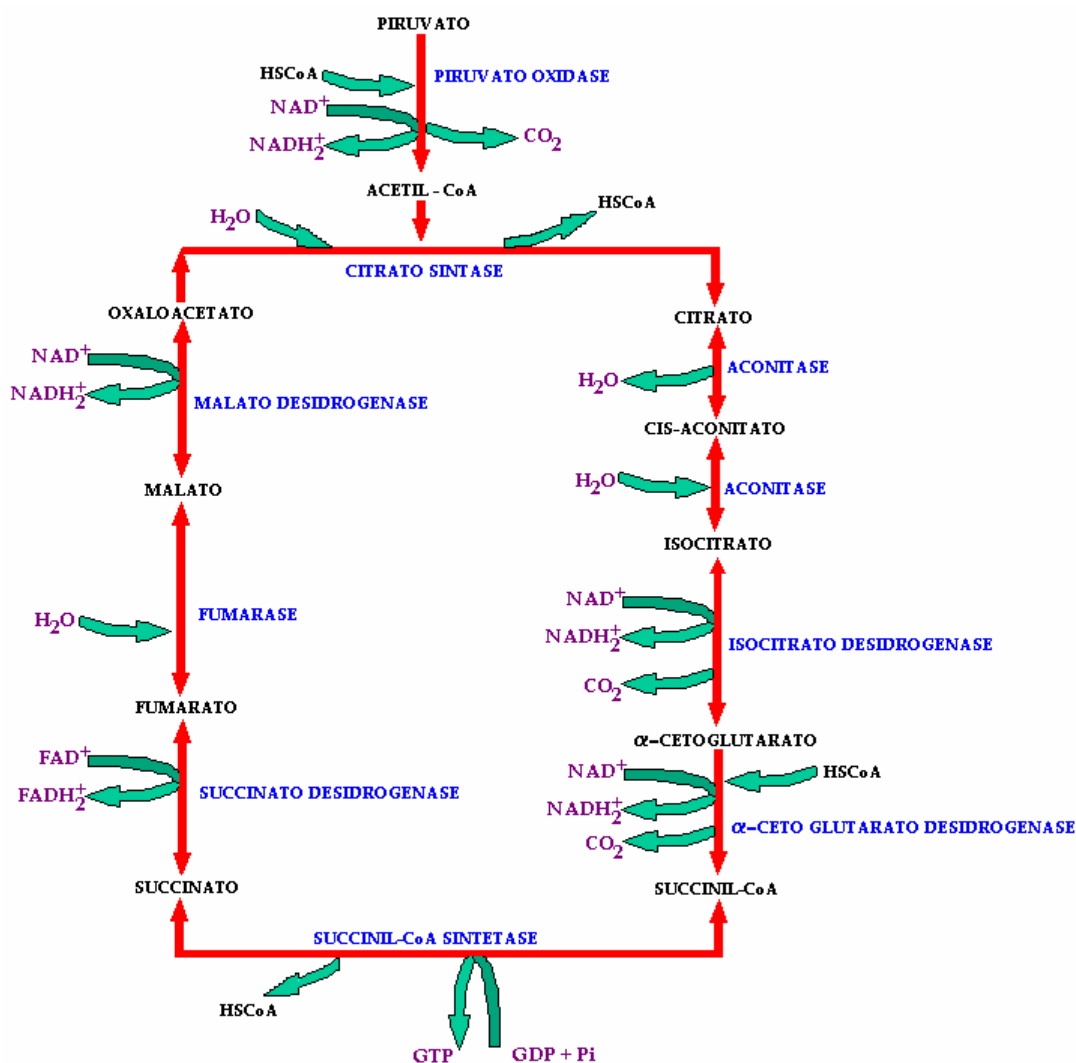


Figura 2.4 – Sequências de reações do Ciclo de Krebs

A dose utilizada de SO₂ varia em função de alguns fatores como: o grau de maturação da uva, seu estado sanitário, sua temperatura, seu teor de açúcar e sua acidez. Entretanto, não existe uma regra fixa para a determinação da quantidade empregada. Assim, mostos de uvas sadias de maturação média e com acidez elevada recebem de 3 a 5g/hL de SO₂, mostos de uvas sadias, bem maduras e com acidez fraca, recebem de 5 a 10g/hL; e mostos de uvas com podridão, são tratados com 10 a 15g/hL. Deve-se salientar ainda, que a maior parte do SO₂ agregado se combina com os constituintes do mosto, por isso nem todo o SO₂ está na forma livre. Além disso também durante a fermentação o SO₂ é arrastado pelo CO₂ (HASHIZUME, 2001).

As vantagens da sulfitagem podem ser resumidas em (RIZZON *et al.*, 1996):

- **Ação seletiva sobre as leveduras:** sua ação seleciona as leveduras que produzem melhores aromas e que apresentam maior capacidade de produção de álcool, ao mesmo tempo que impede o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis durante a fermentação;
- **Ação anti-oxidante:** o gás sulfuroso evita que o oxigênio (ar) altere as características de frescor e frutado dos vinhos. Também evita que os vinhos brancos se tornem oxidados (amarelados) e que os tintos percam sua tonalidade vermelho intenso ou violáceo;
- **Ação anti-oxidásica:** o gás sulfuroso bloqueia a ação das enzimas da podridão do cacho, as quais ocasionam a oxidação e a turvação dos mostos e dos vinhos (casse oxidásica);
- **Ação reguladora da temperatura:** o gás sulfuroso modera a velocidade da fermentação não permitindo que a temperatura se eleve demasiadamente. O vinho assim obtido adquire um aroma mais fino;
- **Ação clarificante** (para os vinhos brancos): ao retardar o início da fermentação, o gás sulfuroso colabora para que ocorra uma melhor clarificação do mosto obtido logo após a prensagem. Isto faz com que as impurezas sejam separadas mais facilmente;
- **Ação conservante:** o gás sulfuroso inibe o desenvolvimento das bactérias responsáveis pelo avinagramento dos vinhos, contribuindo para manter baixos os níveis de acidez volátil.

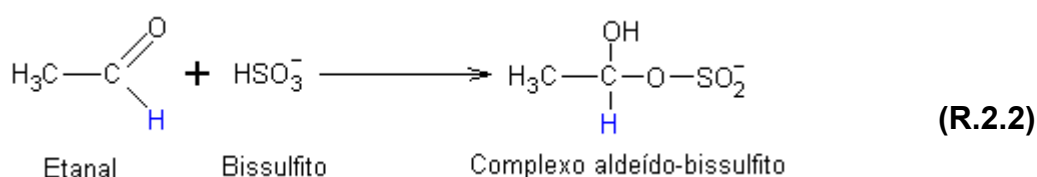
Porém, a sulfitagem apresenta algumas inconveniências quando empregada em doses elevadas. O primeiro inconveniente é retardar ou impedir a fermentação malolática. Outro inconveniente é ser tido como precursor de gosto de sulfeto de hidrogênio, de mercaptana, nos vinhos novos, que permanecem muito tempo sobre suas borras (HASHIZUME, 2001).

2.8 FERMENTAÇÃO GLICÉRICA

Além da fermentação alcoólica, tem grande importância na elaboração de um bom vinho a fermentação glicérica, por meio da qual durante a Segunda Guerra Mundial foram produzidas na Europa, grandes quantidades de glicerina (glicerol), para se obter nitroglicerina (MARZZOCO e TORRES, 1999).

Quando se agrega bissulfito (HSO_3^-) no início de uma fermentação alcoólica, ocorre uma reação entre o acetaldeído e o bissulfito formando um complexo aldeído-bissulfito (Reação R.2.2), que impede a regeneração do NAD^+ , na última etapa da fermentação alcoólica pela enzima álcool desidrogenase. Com isso o microrganismo é forçado a regenerar NAD^+ transformando a diidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato (Figura 2.3). (SIMONETTA, 1990).

Seguindo essa rota metabólica, nota-se que cada mol de glicose forma um mol de glicerol e um do complexo aldeído-bissulfito. Isso se deve ao fato que uma vez o NADH_2^+ oxidado a NAD^+ , mediante a transformação da diidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato na presença da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, novamente existe NAD^+ disponível para que a seqüência normal da fermentação alcoólica ocorra até a formação do etanal, o qual reage com o bissulfito do meio e origina outra vez o complexo aldeído-bissulfito, que se acumula no meio. Assim, novamente é bloqueada a regeneração do NAD^+ , o que leva a uma nova transformação de diidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato. Deve-se notar que na fermentação glicérica não ocorre a transformação da diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído-3-fosfato pela ação da enzima fosfotrioseisomerase, ao contrário do que se observa numa fermentação alcoólica normal (Figura 2.3).



2.9 VINIFICAÇÃO EM BRANCO

Denomina-se vinificação em branco o processo de fermentação alcoólica realizada na ausência da casca ou sem a maceração. A maceração é o processo de extração de compostos presentes na casca baseando-se no princípio de osmose (CATALUÑA, 1984). A técnica de vinificação em branco é geralmente empregada na elaboração de vinho branco, diminuindo o tempo de contato do mosto com suas partes sólidas, o que normalmente dá aos vinhos brancos uma cor amarelada. Por esse processo pode-se produzir vinhos brancos a partir de uvas tintas, pois as matérias corantes estando nas cascas podem ser separadas antes da fermentação, obtendo-se um mosto incolor. Porém, deve-se ressaltar que esse procedimento é pouco empregado na prática, visto que o consumo de vinho tinto é maior que o de vinho branco e também porque a produção de uva branca é mais do que suficiente para a elaboração de vinho branco no Brasil.

Por conseguinte, diferentemente da vinificação em tinto, a qual é realizada na presença da casca ou com a maceração, a prensagem e a trasfega são realizadas antes da fermentação alcoólica para a produção de vinho branco.

O maior inimigo do vinho branco é sem sombra de dúvida o oxigênio, pois quando o vinho branco apresenta uma cor amarelo-escuro é indicativo que esse vinho foi mal elaborado (CATALUÑA, 1984). Outro fato importante para que o vinho branco seja de boa qualidade é que o mosto seja separado imediatamente após o esmagamento. Porém, caso o vinicultor não possua os equipamentos mais adequados para essa finalidade, ele pode obter excelentes resultados aplicando uma dose inicial mais elevada de metabissulfito de potássio de cerca de 25g/hL. Essa adição de metabissulfito de potássio impede que a fermentação se inicie imediatamente após a obtenção do mosto, possibilitando que haja uma razoável separação das impurezas depois de 24 horas (RIZZON *et al.*, 1996).

As operações essenciais nesse tipo de vinificação são o esmagamento e desengamento, escorrimento, prensagem, sulfitação, defecação, correções do mosto, trasfega e fermentação alcoólica, descritas a seguir.

2.9.1 ESMAGAMENTO E DESENGAMENTO

O esmagamento tem por finalidade provocar a ruptura da casca e liberação da polpa. Deve-se evitar o emprego de equipamento muito potente, para não

dilacerar em demasia as partes sólidas da uva. Recomenda-se, de preferência, o uso de esmagadeira de cilindros com ranhuras longitudinais (HASHIZUME, 2001).

Já o desengaçamento, o qual tem por objetivo separar o engaço do mosto antes que este seja bombeado aos tanques de fermentação, é indispensável. A quantidade de mosto a ser bombeada jamais deverá exceder os 80% da capacidade do tanque de fermentação, devido ao desprendimento de gás carbônico durante a fermentação, que provoca um aumento do volume fermentativo em cerca de 20%, podendo levar ao transbordamento do mosto (CATALUÑA, 1984).

2.9.2 ESCORRIMENTO

Essa operação precede a prensagem nas grandes vinícolas, as quais geralmente possuem as máquinas apropriadas denominadas de esgotadores, nas quais as massas vinicas provenientes das esmagadeiras-desengaçadeiras deixam a maior parte do líquido (PATO, 1998).

Assim, as uvas esmagadas e desengaçadas imediatamente passam através de um escorredor (esgotador), que pode ser estático ou dinâmico. O escorrimento pode ser realizado também diretamente na gaiola da prensa horizontal ou vertical, antes de efetuar a prensagem propriamente dita. Realizada essa operação, uma simples prensagem é depois suficiente para retirar o resto de líquido do bagaço.

2.9.3 PRENSAGEM

Esmagadas e desengaçadas as uvas, ficam incorporadas no mosto as matérias sólidas constituídas por película (casca) e sementes. Esse conjunto sólido da massa vínica, denominado bagaço, pode ser quase em sua totalidade separado da fração líquida através do escorrimento seguido da prensagem, ou simplesmente através da prensagem, quando o vinicultor não dispõe do esgotador (PATO, 1998).

Assim, a prensagem é uma operação que se realiza no bagaço não fermentado (caso da vinificação em branco) ou fermentado (caso da vinificação em tinto) com a finalidade de aumentar o rendimento do mosto (HASHIZUME, 2001).

Da prensagem moderada, ou da primeira prensagem, obtém-se o vinho lágrima, de melhor qualidade, e da prensagem mais enérgica obtém-se o vinho prensa. Sobre o vinho prensa pode-se dizer que é concentrado em todos os constituintes, menos em álcool, ao passo que o vinho lágrima é mais rico em aroma e tanino nobre, por isso é misturado com o vinho escorrido sem prensagem.

Portanto, o mosto que escorre primeiro fornece o melhor vinho, pois com o aumento da prensagem ocorre uma maior extração dos compostos da casca, principalmente de polifenóis, gerando assim vinhos com menor fineza de aroma e paladar (RIZZON *et al.*, 1996).

Existem basicamente dois tipos de prensa: a descontínua e a contínua. Entre as descontínuas destacam-se a *prensa vertical com rosca* e a *prensa hidráulica com eixo vertical*. Já referente às prensas contínuas se destaca a *prensa parafuso de Arquimedes*, a qual extrai com maior eficiência em termos de rendimento. No entanto, a qualidade do vinho é prejudicada (HASHIZUME, 2001).

2.9.4 SULFITAGEM

Quando a uva é esmagada e desengaçada e imediatamente escorrida e prensada, o mosto originado, isento de partes sólidas, deve ser sulfitado em uma dose que varia de 15 a 20g de metabissulfito por hL (HASHIZUME, 2001).

Por outro lado, quando o vinicultor não possui os equipamentos mais adequados para promover o escoamento e a prensagem imediatamente após a obtenção do mosto, a sulfitação deve ocorrer depois do esmagamento e desengaçamento aplicando-se uma elevada dose de metabissulfito de potássio de cerca de 25g/hL (RIZZON *et al.*, 1996).

O mosto sulfitado nas dosagens recomendadas previne o início do processo fermentativo vigoroso antes de 24 horas, no primeiro caso, e antes de 48 horas, no segundo caso. Esse período é suficiente para que ocorra a defecação, ou seja, a sedimentação da borra, além disso, para o segundo caso, possibilita que antes da defecação se faça a prensagem.

Na sulfitação é indispensável que o metabissulfito de potássio seja incorporado desde o começo do esmagamento, por partes, isto é, a medida em que o mosto vai chegando ao tanque. Nessa operação é importantíssimo que a dispersão do metabissulfito se faça da maneira mais uniforme possível por todo o mosto (PATO, 1998).

2.9.5 DEFECÇÃO

Essa operação que os franceses chamam de “debourbage”, consiste na depuração, ou melhor, na sedimentação da borra por meio de repouso durante 24 a

48 horas, logo em seguida à prensagem. Essa prática ocorre em tanques fechados e com os mostos sulfitados.

Um mosto defecado durante 1 ou 2 dias separa-se das matérias sólidas próprias da uva, como as cascas e sementes, bem como de partículas de terra que estavam presentes nas uvas antes de serem esmagadas. Além disso, o mosto sofre uma boa esterilização, a qual como operação pré-fermentativa, só traz vantagens. Por esses motivos a defecação proporciona vinhos mais sadios e aromáticos e menos corados também.

Outra importância da defecação se refere a doença case oxidásica, proveniente da podridão das uvas, e tratada com o arejamento do vinho ou mosto em contato com o gás sulfuroso. Por isso, os vinhos defecados ficam praticamente isentos dessa doença, dado que o mosto ao ser defecado deve ser sempre bem arejado para perder o excesso de gás sulfuroso que retardaria o desenvolvimento das leveduras (PATO, 1998).

No tanque onde ocorre a defecação pode se observar que o mosto se apresenta límpido, mais ou menos do meio para cima. No fundo assentam as impurezas mais grosseiras, havendo entre essas duas fases já citadas uma zona intermediária de impurezas constituídas pelas matérias mucilaginosas e pépticas em parte coaguladas pelo gás sulfuroso. As impurezas grosseiras são prejudiciais à qualidade do vinho, entretanto, as mucilagens e as matérias pépticas favorecem o aveludado e o próprio sabor do vinho. Por isso essas substâncias devem estar presentes no mosto que irá ser fermentado.

Decorrido o tempo suficiente para que as impurezas depositem, faz-se a trasfega deste mosto para o tanque onde ocorrerá a fermentação. Do volume inicial levado para o tanque de defecação $\frac{3}{4}$ são enviados para a fermentação, já o restante com as impurezas grosseiras se junta a uma fermentação de vinho tinto, ou fermenta-se em separado para obter um vinho de segunda.

Deve-se salientar que, como os mostos defecados são sulfitados em excesso, na trasfega esses mostos devem ser fortemente arejados para perderem esse excesso de anidrido sulfuroso (PATO, 1998).

2.9.6 TRASFEGA

Essa operação nada mais é do que a separação do vinho límpido da borra, porém tem grande importância para que se possa obter vinhos sem defeitos de cheiros e com boa limpidez.

Na vinificação em branco realiza-se a primeira trasfega antes da fermentação alcoólica, isto é, assim que a defecação esteja completada. Nesta trasfega deve-se incorporar ao vinho certa quantidade de oxigênio (ar), o qual possui efeitos benéficos por favorecer ao desenvolvimento das leveduras e por desprender o excesso de gás sulfuroso que estiver presente (RIZZON *et al.*, 1996).

Para acelerar os processos de defecação e trasfega, modernamente utiliza-se o processo de centrifugação (HASHIZUME, 2001).

2.9.7 CORREÇÃO DO MOSTO

Como já mencionado, sabe-se que o mosto geralmente necessita de algumas correções, especialmente referentes à concentração de açúcar e acidez.

A prática da “chaptalização” não deve ser feita sem critérios, já que um excesso de açúcar provoca um desequilíbrio no vinho sob o aspecto degustativo. Além desse problema, existe o fato da legislação brasileira atual permitir que apenas 30% do álcool presente no vinho seja proveniente do açúcar de cana (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

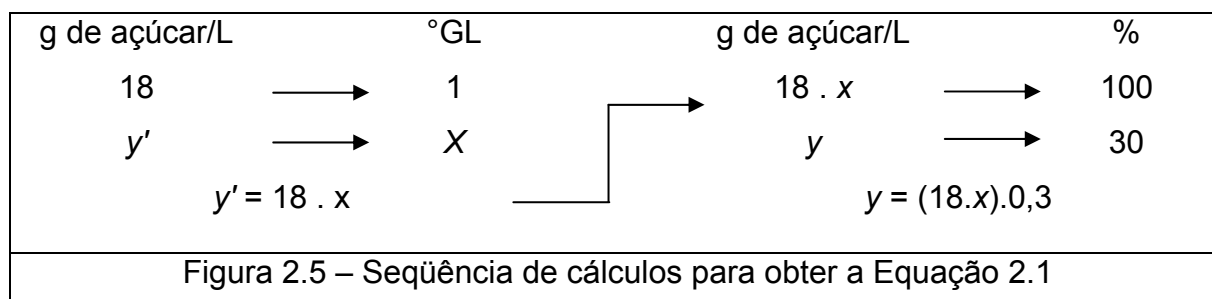
Sabendo que na prática é necessário adicionar 18g de açúcar por litro para que se eleve 1°GL (HASHIZUME, 2001) e tendo conhecimento das informações da legislação brasileiras citadas acima, pode-se estabelecer uma relação que forneça a máxima quantidade de açúcar que pode ser adicionada ao mosto. Essa relação está dada pela Equação 2.1. Os cálculos para se obter a Equação 2.1 estão esquematizados na Figura 2.5.

$$y = 5,4 \cdot x \quad (2.1)$$

onde:

x = graduação alcoólica mínima esperada (°GL);

y = quantidade máxima de açúcar que pode ser adicionada (g/L).



A Equação 2.1 é importante para se estabelecer o limite para a “chaptalização”. Porém, essa equação não leva em consideração a concentração de açúcar presente no mosto, o que possibilita a obtenção de vinhos com uma graduação maior ou menor do que a esperada. Apesar da Equação 2.1 não levar em consideração o teor de açúcar presente no mosto ela é bastante empregada na prática das vinícolas, pois após os mostos serem fermentados em tanques pequenos eles são armazenados em tanques maiores, fazendo com que ocorra uma mistura dos vinhos provenientes das distintas fermentações. Essa mistura proporciona uma mescla dos vinhos que ficaram com uma graduação alcoólica elevada com aqueles que não atingiram a graduação esperada.

Quando o vinicultor dispõe de um refratômetro, a quantidade de açúcar a ser adicionada ao mosto se baseia no conhecimento prévio da concentração de açúcar no mosto da uva, o qual, na prática, é dado em grau Babo ou em grau Brix. Sabendo que o grau Babo é definido como sendo a quantidade de açúcar contida em 100mL de mosto (g de açúcar/ 100mL de mosto) e que 1,8 graus Babo equivalem aproximadamente 18g de açúcar por litro, pode-se através da determinação do grau Babo do mosto e utilizando a Equação 2.2 estabelecer qual é a concentração de açúcar que deve ser adicionada ao mosto para que se obtenha uma determinada graduação alcoólica no futuro vinho. Os cálculos para se obter a Equação 2.2 estão esquematizados na Figura 2.6.

$$z = \left(x - \frac{B}{1,8} \right) \cdot 18 \quad (2.2)$$

onde

B = Grau Babo medido no mosto;

x = Graduação alcoólica esperada (°GL);

z = concentração de açúcar que vai ser adicionada ao mosto (g/L).

g de açúcar/L		°GL		g de açúcar/L		Grau Babo
18	→	1		18	→	1,8
z'	→	x		z''	→	B
		$z' = 18 \cdot x$				$z'' = (18 \cdot B)/1,8$
Figura 2.6 – Seqüência de cálculos para obter a Equação 2.2						

O grau Brix é definido como sendo a quantidade de sólidos solúveis presentes no mosto (massa de açúcar (g) solúvel em 100g de solução), sendo que 2°Brix promove a formação de 1°GL. Assim, quando na prática se tem o valor dessa medida pode-se determinar qual é a concentração de açúcar que deve ser adicionada ao mosto para que se obtenha uma determinada graduação alcoólica no futuro vinho através da Equação 2.3.

Deste modo, da mesma forma quando se determinou a relação entre o grau Babo e a concentração de açúcar, pode-se para o caso do grau Brix obter-se que:

$$z = \left(x - \frac{Brix}{2} \right) \cdot 18 \quad (2.3)$$

onde

$Brix$ = Grau Brix medido no mosto;

x = Graduação alcoólica esperada (°GL);

z = concentração de açúcar que vai ser adicionada ao mosto (g/L).

Portanto, é conveniente determinar a quantidade de açúcar a ser adicionada pelas Equações 2.2 e 2.3 e verificar se esse valor não ultrapassou o valor da quantidade máxima de açúcar permitida pela legislação brasileira obtida pela Equação 2.1.

Outra correção que pode ser necessária é a acidificação. Essa operação emprega normalmente o ácido tartárico. Teoricamente são necessários 1,53g de ácido tartárico por litro de mosto para aumentar 20mEq/L de acidez total. Entretanto, na prática utiliza-se de 1,8 a 2g de ácido tartárico por litro de mosto, visto que uma parte do ácido adicionado se precipita na forma de bitartarato de potássio (HASHIZUME, 2001).

Por outro lado, quando uma desacidificação do mosto é necessária, pode-se utilizar a desacidificação biológica por meio das *Schizosaccharomyces* ou a

desacidificação química, a qual na prática utiliza aproximadamente 0,1g de carbonato de cálcio ou 0,25g de tartarato de potássio por litro de mosto (HASHIZUME, 2001).

2.9.8 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O mosto sulfitado, defecado e trasfegado apresenta uma população bem reduzida de leveduras, por isso é recomendável a utilização de pé-de-cuba na base de 5% ou levedura seca e ativa na base de 10 a 15g/hL, para que a fermentação ocorra de maneira mais rápida e regular. Do contrário, o início da fermentação é normalmente lento e demorado (HASHIZUME, 2001).

A temperatura ideal da fermentação de um vinho branco é bem inferior á da vinificação em tinto, estando a temperatura ótima situada entre 18 e 20°C. Porém, para controlar a temperatura nessa faixa necessita-se de um sistema de resfriamento do mosto, recurso pouco disponível para os pequenos vinicultores. Entretanto, sabe-se que até 25°C as fermentações fornecem ótimos resultados (PATO, 1998). Isso é importante ser salientado visto que o uso da remontagem com arejamento do mosto proporciona um bom controle da temperatura próximo dos 25°C.

Quando a fermentação ultrapassar a fase turbulenta (aproximadamente 4 dias após o início da fermentação), ou melhor, quando a densidade do mosto estiver em torno de 1,050 a 1,010, efetua-se a segunda trasfega com a finalidade de se eliminar a borra, que pode conferir gosto indesejável ao vinho. O vinho trasfegado contém ainda um pouco de açúcar. Isso faz com que o mosto continue fermentando por mais um certo tempo. Esse período de fermentação é denominado fase da fermentação lenta, a qual deve ocorrer sem contato com o ar. Isto pode ser obtido através do uso de um batoque hidráulico, o qual nada mais é do que um dispositivo que permite a saída do gás carbônico proveniente da fermentação e impede a entrada do ar no recipiente onde está ocorrendo a fermentação.

O vinho branco requer mais cuidados do que o vinho tinto, principalmente no que se refere a oxidação. Portanto, logo que o vinho estiver completamente sem açúcar (vinho seco), deve-se efetuar o controle de SO₂ presente no vinho adicionando a segunda dose de metabissulfito de potássio, promover o atesto e substituir o batoque hidráulico por um batoque simples, que vede por completo o recipiente.

Após o término da fermentação, deve-se efetuar mais uma trasfega 1,5 a 2 meses depois da segunda trasfega.

2.9.9 CLARIFICAÇÃO

Para o vinho apresentar limpidez, ele deve sofrer uma filtração, a qual é geralmente precedida de uma colagem.

2.9.9.1 Colagem

A colagem consiste na adição ao mosto de produtos clarificantes, capazes de coagular e formar flocos. Os flocos, ao sedimentarem, arrastam as partículas causadoras da turbidez e clarificam o vinho.

Os produtos utilizados para a clarificação são denominados colas na linguagem enológica, e são geralmente de natureza protéica.

No mecanismo de colagem verificam-se duas etapas: inicialmente a cola reage com os polifenóis do vinho, as leucoantocianinas ou taninos, coagulando-os e insolubilizando-os. Posteriormente, com o prolongamento do tempo de contato, ocorre a formação dos flocos cada vez maiores que, ao sedimentarem, arrastam as impurezas para o fundo do tanque.

Entretanto, além do efeito clarificante, o uso das colas fornece outras vantagens ao vinho, as quais, segundo Pato (1998), são:

- Um complemento ao tratamento das doenças, visto que, além de arrastar as impurezas também são sedimentadas as substâncias albuminóides, as quais são utilizadas pelas bactérias como alimento;
- Um amaciamento do vinho devido à deposição de substâncias que tornam o paladar adstringente;
- Uma diminuição da cor.

Atualmente, utilizam-se diferentes produtos para a colagem, os quais são divididos em três grupos, segundo sua origem:

- *Substâncias albuminóides*: inclui a clara de ovo, albuminas secas de ovo e de sangue, sangue fresco, caseína e o leite puro;
- *Substâncias gelatinosas*: inclui as colas de ossos, as colas de pele, as colas de peixe, o agar-agar;
- *Substâncias minerais*: inclui o barro espanhol, a bentonita e ainda a areia e o gesso.

Alguns fatores que afetam o mecanismo da colagem, sendo eles:

- A quantidade e natureza da cola: Isso mostra a necessidade de efetuar um ensaio prévio para estabelecer a dosagem adequada a empregar;
- O teor de tanino do vinho a tratar: O vinho branco é normalmente pobre em tanino; sendo assim, recomenda-se a adição de tanino antes da colagem. Quando existe falta de tanino ou excesso de cola, surge o problema de sobrecolagem, e o vinho volta a turvar após algum tempo;
- A baixa temperatura favorece a colagem: Desta forma recomenda-se efetuar esta prática nos períodos mais frios do ano;
- Repouso: o vinho que será submetido à colagem deve estar em repouso, sem nenhum sinal de fermentação. Do contrário, não será possível a sedimentação dos flocos.

Deve-se salientar que toda colagem deve ser seguida de uma trasfega após a sedimentação dos flocos.

A bentonita é uma substância mineral bastante empregada na clarificação de vinho, sobretudo em vinhos brancos, para a eliminação da turvação protéica ou casse protéica. Trata-se de um mineral, da família da argila, de silicato de alumínio hidratado, cuja composição principal é montmorilonita ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ela apresenta a capacidade de intumescer e agregar até 10 vezes o seu peso em água. Devido a essa alta capacidade de intumescer um grama de bentonita em suspensão na água apresenta uma superfície de aproximadamente 5m^2 . Isto permite preparar uma pasta gelatinosa de característica coloidal e de carga eletronegativa, o que lhe confere um forte poder de adsorção, visto que as proteínas apresentam-se eletropositiva no pH do vinho (HASHIZUME, 2001).

Existem muitos tipos de bentonita, porém para a utilização enológica são recomendadas as bentonitas de reação alcalina, ativadas pelo carbonato de sódio.

A bentonita pode ser empregada no mosto em fermentação, no vinho pronto, ou nas duas ocasiões. Depois de ter exercido sua ação, a bentonita, deposita-se no fundo do tanque juntamente com a borra, sendo separada através de uma trasfega, geralmente realizada 8 a 10 dias após a sua aplicação (RIZZON *et al.*, 1996).

O emprego da bentonita no mosto no início da fermentação alcoólica apresenta algumas vantagens em relação à aplicação no vinho pronto, pois:

- Reduz o número de manipulações;
- Sedimenta espontaneamente ao final da fermentação alcoólica;
- Exerce um controle sobre a oxidação, reduzindo a coloração amarelada e contribuindo para melhorar o gosto e o aroma do vinho branco.

Apesar de ter dado ênfase a bentonita, por se a mais utilizada no Brasil, é importante saber que qualquer tipo de colagem permite reduzir gradativamente a turbidez do vinho. Entretanto, para tornar o vinho límpido e brilhante, é necessário submetê-lo a uma filtração.

2.9.9.2 Filtração

A filtração é uma técnica de clarificação do vinho, que consiste em passar o mesmo através de uma meio filtrante, com porosidade reduzida. Existem vários tipos de filtros para vinhos, todos eles baseados em adsorção ou tamisação. Nos vinhos turvos, com impurezas de grande dimensão, utilizam-se filtros com princípio de tamisação, como os filtros de terra de diatomácea ou kieselguhr, depositados sobre um suporte poroso ou tela de malhas bem reduzidas.

Entretanto, para um vinho quase limpo, que se pretende tornar límpido e brilhante, utiliza-se filtro com princípio de adsorção. Como exemplo desse tipo, tem-se o filtro prensa de placas. Nesse tipo de filtro, existem placas esterilizantes que permitem reter os microrganismos (leveduras e bactérias) e filtros de membrana que apresenta porosidade reduzida, proporcionando acabamento refinado, principalmente para o vinho branco seco.

Deve-se destacar que os vinhos provenientes de uvas atacadas de podridão ou saídos das prensas contínuas normalmente são ricos em pectinas, gomas, dextranas e outros colóides, os quais dificultam tanto a colagem como a filtração. Tem-se recomendado neste caso a incorporação aos vinhos a clarificar ou a filtrar, de substâncias coadjuvantes da limpidez por ação indireta, das quais se destacam as enzimas pectinolíticas (PATO, 1998).

As enzimas pectinolíticas têm sua adição recomendada tanto nos mostos fermentativos quanto no tratamento prévio dos vinhos que serão submetidos a colagem e posterior filtração. A justificativa para o seu emprego no mosto fermentativo no momento da fermentação deve-se à capacidade das enzimas pectinolíticas em digerir as paredes celulares das películas (cascas), facilitando

assim a extração da matéria corante e das substâncias aromáticas. Já sua utilização nas operações de colagem e filtração se justifica pelo fato de que essas enzimas rompem a estrutura coloidal das pectinas, gomas e outras substâncias que, no seu estado normal dificultam ou impedem a clarificação dos vinhos (PATO, 1998).

Um problema que pode ocorrer no vinho, após ele ser filtrado, é a volta da turvação. Esse problema é pouco freqüente nos vinhos que atingiram a primavera, porém é freqüente em vinhos novos, ou seja, antes de ter passado pelo período mais frio do ano (inverno). A turvação retorna porque ocorre uma quebra do equilíbrio entre algumas das substâncias que compõe o vinho, em especial as matérias coloidais, sais ácidos e matérias corantes, devido à filtração de um vinho ainda não estabilizado. Logo, para resolver esse problema basta efetuar a filtração depois de transcorrido certo tempo após a trasfega realizada posteriormente a colagem, isso porque a aeração proporcionada pela trasfega proporciona a oxidação indispensável à estabilização da matéria corante e a coagulação dos albuminóides.

Após a filtração é recomendado que se promova uma correção no teor de SO_2 livre, para compensar a aeração que o vinho recebeu durante essa operação. Depois da correção o vinho deve apresentar uma concentração que varia de 30 a 40mg/L de SO_2 no estado livre.

2.9.10 CONSERVAÇÃO

Terminada a fermentação, o vinho deverá receber cuidados durante a sua estocagem, a fim de conservá-lo. Além das trasfegas já mencionadas anteriormente, deve periodicamente ser atestado.

O atesto consiste na operação de suprir o espaço vazio do recipiente com o vinho. Normalmente o vinho conservado em recipientes de madeira, devido à evaporação, tende a deixar um espaço vazio. Se o espaço vazio permanecer, o desenvolvimento de microrganismos aeróbicos indesejáveis ao vinho pode ser favorecido. O vinho de atesto deve ser sempre da mesma qualidade ou superior, límpido e estável. Esse vinho é geralmente guardado em recipientes de 100 a 500 litros e para facilitar sua conservação deve-se elevar sua graduação alcoólica ($\approx 15^\circ\text{GL}$) e seu teor de SO_2 livre (CATALUÑA, 1984).

2.9.11 ENVELHECIMENTO

É recomendado que o vinho branco não seja envelhecido por muitos anos. Apesar de ser curto esse período, algumas transformações devem ser mencionadas.

De forma geral, o envelhecimento é realizado ao abrigo de oxigênio, como no caso dos vinhos de mesa, e especialmente nos vinhos finos, os quais são conservados com precaução, limitando ao máximo a dissolução de oxigênio e sempre os protegendo com uma ligeira sulfitação (HASHIZUME, 2001).

Para facilitar a compreensão do tema, deve-se mencionar que existem dois tipos básicos de envelhecimento. As reações de redução transcorrem sem contato com o oxigênio, consistindo em uma série de reações demoradas entre os componentes do vinho armazenado em recipientes como vidro e cimento bem tratado. Já as reações de oxidação ocorrem na presença do oxigênio captado pelo vinho do ar, em vinhos armazenados em recipientes de paredes porosas, como a de madeira.

A redução e a oxidação seguem caminhos opostos, que levam a resultados diferentes. São fenômenos que incidem sobre o álcool, ácidos e especialmente sobre os taninos e as matérias corantes, em intensidade que varia com o tipo de vinho e com outros fatores que a enologia ainda não compreende claramente. Por meio dos conhecimentos adquiridos pela teoria assim como pela experiência prática, sabe-se que não pode haver envelhecimento de um vinho ou de uma aguardente sem elementos transformáveis e catalisadores que favoreçam as reações necessárias. Por isso, um vinho que envelhece em contato com a madeira (perfeitamente isolada do ar) apresenta um grau mais elevado no afinamento (PATO, 1998). Por outro lado, o oxigênio dissolvido não se combina diretamente com as substâncias redutoras do vinho, tais como os compostos fenólicos, sem o auxílio de catalisadores, como o ferro e o cobre (HASHIZUME, 2001).

Os vinhos não envelhecem nas garrafas graças ao oxigênio, ao contrário, eles envelhecem graças à ausência do mesmo, pois a presença do referido gás prejudica o envelhecimento. O envelhecimento na garrafa se dá pelo fenômeno inverso da oxidação, isto é, pela redução. Esse fenômeno pode ser verificado medindo-se o potencial de oxirredução, que atinge seu valor mínimo na garrafa após vários meses. O buquê dos vinhos só aparecerá em potencial baixo. Ele é constituído de substâncias odorantes agradáveis na forma reduzida e, portanto, facilmente destruídas em contato com o oxigênio do ar (HASHIZUME, 2001).

2.10 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

No presente tópico serão apresentadas aplicações dos métodos estatísticos no planejamento experimental assim como a metodologia para otimização de experimentos, utilizando-se para isso alguns exemplos.

2.10.1 APLICAÇÃO DE MÉTODOS ESTATÍSTICOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Suponha que um engenheiro químico deseje otimizar o rendimento em etanol com relação ao substrato (η_{Et}) de certa fermentação, e que essa fermentação seja influenciada principalmente por duas variáveis: a temperatura e o pH. Assim sendo, neste caso o η_{Et} é a resposta procurada e as variáveis temperatura e pH são os fatores que, a princípio, influenciam a resposta. Portanto para se otimizar o η_{Et} dessa fermentação deve-se descobrir quais os valores das duas variáveis que produzem o maior rendimento.

O procedimento correto que o engenheiro químico deve utilizar para alcançar seu objetivo consiste em fazer variar, ao contrário do que se poderia esperar, todas as variáveis ao mesmo tempo. A razão para isso é que as variáveis podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. Este comportamento é chamado de interação entre as variáveis, e é um fenômeno que ocorre com muita frequência. Raras são as situações em que duas variáveis atuam de forma independente (BARROS *et al.*, 2002).

Para se investigar os efeitos de todos esses fatores sobre todas as propriedades, minimizando o esforço experimental necessário e o custo dos experimentos, deve-se utilizar um planejamento experimental adequado baseado em princípios estatísticos, pois se pode extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil de forma racional, econômica e fazendo um número mínimo de experimentos. Ao se adotar o método adequado de planejamento experimental para a realização de um estudo que envolva muitas variáveis, facilita-se a execução de forma organizada de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Com isso existe a possibilidade de se verificar os efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre as respostas, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a

modelagem empírica dos resultados, em função das variáveis escolhidas, através de programas estatísticos de regressão (BOX *et al.*, 1978).

2.10.2 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura. Os métodos de planejamento experimentais mais conhecidos para otimizar processos são o *simplex*, o *planejamento fatorial* e o *método de análise por superfície de resposta* (BARROS *et al.*, 2002).

Quando o objetivo principal do pesquisador é otimizar o seu sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta. Uma técnica conveniente para isso é o *método de análise por superfície de resposta*, o qual tem como base o método de planejamento fatorial (BOX *et al.*, 1978).

Este método consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento, produtividade, entre outras) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (como temperatura, pH e outras). Estas técnicas são usadas para resolver principalmente as seguintes questões:

- Como uma resposta particular é afetada, sobre uma região de interesse, por um dado conjunto de variáveis de entrada;
- Quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas;
- Quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor resultado para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto (BOX *et al.*, 1978).

Um dos problemas mais comuns que um experimentador pode enfrentar é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Por exemplo, um engenheiro químico ao estudar certa fermentação, pode estar querendo saber como o rendimento em etanol com relação ao substrato (η_{Et}) seria afetada se ele variasse a temperatura e/ou o pH. Portanto, ele está interessado em descobrir como a resposta (η_{Et}) depende dos dois *fatores* mencionados, a temperatura e o pH. Esse problema pode ser encarado como um caso particular da situação geral em que certo número de fatores, F_1, F_2, \dots, F_k , está atuando sobre um

sistema em estudo produzindo as respostas R_1, R_2, \dots, R_j . O sistema é considerado como uma função desconhecida que atua sobre as variáveis de entrada (os fatores) e produz como saída as respostas observadas. O objetivo do estudo é determinar essa função, ou pelo menos obter uma aproximação satisfatória para ela, a partir dos dados experimentais.

A primeira coisa a fazer, no planejamento de um experimento, é determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores, isto é as variáveis controladas pelo experimentador, tanto podem ser qualitativos (se estivesse preocupado com o tipo de levedura) como quantitativos (como a temperatura). Dependendo do problema, pode haver mais de uma resposta de interesse. Eventualmente essas respostas também podem ser qualitativas (BARROS *et al.*, 2002).

2.10.3 PLANEJAMENTO FATORIAL

Para a realização de um planejamento fatorial precisa-se, em primeiro lugar, especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores (ou as versões, nos casos qualitativos) que serão empregados nos experimentos. Assim, fixado os níveis de cada uma das variáveis de entrada (dos fatores) deve-se, então, executar os experimentos em todas as combinações possíveis. Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento com dois níveis (nível +1 e nível -1) para cada fator é muito eficiente (BOX *et al.*, 1978).

Para facilitar a compreensão do planejamento, por exemplo, pode-se imaginar que se queira estudar o efeito do fator temperatura em dois níveis 20°C (nível -1) e 28°C (nível +1), e o efeito do pH também em dois níveis 3,0 (nível -1) e 3,6 (nível +1). Como um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores, cada combinação desse conjunto de níveis definido é um ensaio experimental a ser realizado. Havendo 2 níveis num fator e 2 no outro, como nesse caso, serão necessários $2 * 2 = 4$ ensaios diferentes, e o planejamento é chamado de fatorial $2 * 2$. Isto não significa obrigatoriamente que serão realizados apenas $n_1 * n_2$ experimentos. Este é o número mínimo, para se ter um planejamento fatorial completo. Porém o experimentador pode querer repetir ensaios, para ter uma estimativa do erro experimental, e nesse caso o número total de experimentos será maior.

A forma mais recomendada para se determinar o erro experimental, consiste em realizar ensaios em triplicata nas condições intermediárias entre as dos dois níveis atribuídos a cada fator (nível zero ou ponto central) (BOX *et al.*, 1978). O ponto central é o valor médio entre o nível inferior (-1) e o superior (+1) de cada fator. Além disso, o ponto central deve ser experimentado exatamente nas mesmas condições, sendo as diferenças entre seus valores resultantes apenas de erros experimentais (HAALAND, 1989).

Devidos aos fatos apresentados acima a triplicagem no ponto central tem de consistir numa *repetição autêntica*, isto é, *todas* as etapas do processo em estudo devem ser iguais, desde a limpeza do recipiente antes de se iniciar o experimento até a separação e a análise do produto final. Se as repetições forem realizadas de forma imprópria, sem refletir a variabilidade total do processo, os erros parecerão menores ou maiores do que na realidade são (BARROS *et al.*, 2002).

Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é portanto o mais simples de todos eles. Havendo k fatores, isto é, k variáveis controladas pelo experimento (temperatura e pH, por exemplo), o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de $2 * 2 * \dots * 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamado por isso de *planejamento fatorial 2^k* .

No planejamento fatorial deve-se codificar as variáveis independentes, pois a codificação permite comparar diretamente os coeficientes de fatores diferentes entre si, avaliando a importância relativa dos mesmos. Desse modo, -1 representa o nível inferior da variável e +1 o nível superior, como já mencionado anteriormente (MYERS, 1976; HAALAND, 1989).

A codificação das variáveis é feita através da Equação 2.4 (MYERS, 1976):

$$x_{i \text{ codificado}} = \frac{\bar{x}_i - x_i}{\Delta x / 2} \quad (2.4)$$

onde:

$$\bar{x}_i = \frac{x_{+1} + x_{-1}}{2};$$

$$\Delta x = x_{+1} - x_{-1};$$

$x_{\pm 1}$ = valor das variáveis em unidades originais, fixado no planejamento fatorial em dois níveis (-1 e +1);

x_i = unidade original da variável que se quer codificar.

2.10.4 METODO DE ANÁLISE POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, de Response Surface Methodology) é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamento fatorial, introduzida por G. E. P. Box na década de 50, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos.

A metodologia de análise por superfície de resposta é constituída de duas etapas distintas: *modelagem* e *deslocamento*, sendo que essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, até que o objetivo de se atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada seja alcançado. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima (ou mínima) inclinação, conhecido também como *steepest ascent*, de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS *et al.*, 2002).

O método por superfície de resposta é muito eficiente se comparado àquele que mantém todas as variáveis constantes, exceto uma, que varia, ou quando comparado ao planejamento ortodoxo que testa todas as combinações possíveis dos fatores. A grande vantagem do método de superfície de resposta é que este fornece a base para uma nova experimentação, que conduz a um novo modelo, caso o modelo inicial não seja o mais adequado (HIMMELBLAU, 1970).

Para tentar esclarecer a utilização do método de análise por superfície de resposta continuar-se-á usando o exemplo do engenheiro químico que está investigando o efeito de dois fatores (temperatura e pH) no rendimento em etanol com relação ao substrato (η_{Et}) em uma fermentação alcoólica.

Ao todo devem ser realizados sete ensaios, sendo três deles repetições no ponto central. Isso permite verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear, o que seria impossível se tivesse sendo usado apenas dois níveis.

A análise deve ser começada admitindo que a superfície de resposta na região investigada é uma função linear dos fatores, e que portanto a resposta pode ser estimada pela Equação 2.5.

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 \quad (2.5)$$

onde:

b_0 , b_1 e b_2 são estimadores dos parâmetros do modelo;

x_1 e x_2 representam os fatores codificados.

Caso o modelo linear não correlacione bem os dados experimentais, deve-se partir para um modelo quadrático, cuja expressão geral, para duas variáveis é dada pela Equação 2.6.

$$y = b_0 + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2.6)$$

Nota-se que este modelo tem seis parâmetros, e o planejamento fatorial 2^2 com o ponto central tem apenas cinco níveis, isto é, cinco diferentes combinações de valores de temperatura e pH. Como não é possível encontrar uma solução quando há mais parâmetros do que níveis, faz-se necessário ampliar o planejamento. A ampliação pode ser feita de várias maneiras, sendo a mais comum à construção do chamado *planejamento em estrela* (BARROS *et al.*, 2002).

Para fazer um planejamento em estrela, simplesmente basta acrescentar ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida, resultando em uma distribuição octogonal. Um argumento geométrico simples permite concluir que os novos pontos, assim como os primeiros, estão a uma distância de $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central. Todos eles estão portanto sobre uma circunferência de raio $\sqrt{2}$.

Para verificar-se o rendimento em etanol com relação ao substrato (η_{Et}) de um ensaio é diferente da do outro ou para saber se a equação de regressão é estatisticamente significativa, deve-se aplicar os chamados *testes de hipóteses*, *testes de significância* ou *regras de decisão*. Porém antes de descrever esses testes, deve estar claro que uma hipótese estatística é uma afirmação sobre uma dada população, cuja validade é avaliada a partir da informação obtida de amostras da mesma. Quando uma investigação é relacionada a um fato baseado na amostra, a negação desse fato é considerada como *hipótese nula* (H_0) e o fato a ser comprovado pelos dados experimentais é considerada como *hipótese alternativa* (H_1) (SPIEGEL, 1978).

O principal objetivo de testar uma hipótese é responder à seguinte questão: dadas duas amostras, são elas realmente diferentes ou pertencem a uma mesma população? Em outras palavras, é determinar com razoável e conhecida certeza se as diferenças encontradas entre duas ou mais amostras são verdadeiras ou podem ser explicadas pelo acaso, ou seja, pela variabilidade da amostra. Além disso, deve-

se salientar que uma hipótese nula é aquela que simplesmente afirma que não há diferença entre os grupos estudados; trata-se de uma hipótese que atribui ao acaso a ocorrência do fenômeno ou resultado observado (DORIA, 2001).

Assim, os resultados obtidos da análise dos dados pelo método de análise por superfície de resposta podem ser avaliados em relação à sua compatibilidade com os dados experimentais, usando-se como parâmetro o valor estimado para o teste F (JURAN, 1992; SPEIGEL, 1978).

O valor estimado de F possibilita a realização do teste F, que consiste em comparar esse valor, obtido através dos dados experimentais, como o valor tabelado de F. Se o valor estimado de F for maior que o valor tabelado de F para um nível de significância α , então a *hipótese nula* (H_0) é rejeitada.

2.11 OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE MULTI-RESPOSTA

A metodologia de otimização simultânea de multi-resposta proposta por DERRINGER & SUICH em 1980 está baseada no conceito da “função de desejabilidade” para cada resposta (BARROS *et al.*, 2002).

A “função de desejabilidade” envolve a transformação de cada variável resposta estimada pelo modelo, Y_k^{Mod} , a um valor d_k entre 0 e 1 (Equação 2.7). Este valor de d_k aumenta à medida que a correspondente “desejabilidade” da resposta aumenta. Estas funções d_k individuais são então combinadas, em uma única função D (Equação 2.8), a qual normalmente é dada pela média geométrica das k desejabilidades individuais.

Este valor único de D fornece a “desejabilidade” global das respostas combinadas, sendo que estes valores compreendidos entre 0 e 1 e aumentarão à medida que o balanceamento entre as respostas se torna mais favorável. A razão pela qual a função D é dada pela média geométrica está baseada na propriedade de tornar-se nula se qualquer d_k for igual a 0, ou seja, se qualquer uma das variáveis resposta é inaceitável mesmo que os outros valores das outras respostas sejam satisfatórios.

Portanto, o método de otimização simultânea de multi-resposta está fundamentado num balanceamento entre as várias respostas, em relação a métodos que otimizem uma resposta enquanto mantém a outra constante, ou seja, considera uma única resposta formada pela combinação de todas as respostas simultâneas

através de uma determinada lei, que neste caso é uma média geométrica entre as respostas individuais. Assim, a “função de desejabilidade” condensa uma otimização de várias respostas em um problema com uma única função resposta (D), na qual técnicas de busca univariada podem ser utilizadas na sua maximização, ou minimização.

Esta função de transformação d_k está representada pela Equação 2.7 e é utilizada quando a variável resposta Y_k^{Mod} é restrita tanto por um valor máximo quanto por um valor mínimo.

$$d_k = \left\{ \begin{array}{l} \left[\frac{Y_k^{\text{Mod}} - Y_k^{\text{Min}}}{Y_k^{\text{Des}} - Y_k^{\text{Min}}} \right]^s \quad Y_k^{\text{Min}} \leq Y_k^{\text{Mod}} \leq Y_k^{\text{Des}} \\ \left[\frac{Y_k^{\text{Mod}} - Y_k^{\text{Max}}}{Y_k^{\text{Des}} - Y_k^{\text{Max}}} \right]^t \quad Y_k^{\text{Des}} < Y_k^{\text{Mod}} \leq Y_k^{\text{Max}} \end{array} \right\} \quad (2.7)$$

$$d_k = \left\{ 0 \quad Y_k^{\text{Mod}} < Y_k^{\text{Min}} \quad \text{ou} \quad Y_k^{\text{Mod}} > Y_k^{\text{Max}} \right\}$$

Onde Y_k^{Min} e Y_k^{Max} são, respectivamente, os valores mínimo e máximo aceitáveis de Y_k^{Mod} ; Y_k^{Des} o valor que se deseja obter de Y_k^{Mod} , e s e t parâmetros escolhidos pelo experimentador a partir de suas necessidades.

Estas funções d_k individuais são então combinadas, em uma única função D utilizando-se de uma média geométrica, representada pela Equação 2.8.

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_k)^{1/k} \quad (2.8)$$

Deve-se ressaltar que a taxa de variação da desejabilidade com a resposta estimada pelo modelo é definida pelos expoentes s e t. Fazendo-os variar, pode-se atribuir diferentes desejabilidades aos diversos níveis de resposta. Assim, valores altos dos dois expoentes farão com que a desejabilidade caia rapidamente, tornando se muito baixa a menos que Y_k^{Mod} esteja muito perto do alvo. Os cálculos são realizados por algum programa de varredura, tendo como função objetivo a maximização do valor de D, obtido pela Equação (2.8).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

Foram utilizados 2 microrganismos: a) leveduras selvagens, presentes no próprio meio fermentativo proveniente da Vitivinícola Góes (ensaios 1 a 22), no qual predomina a levedura *Saccharomyces cerevisiae*; b) levedura selecionada seca e ativa Mauriferm® Y-904 da COATEC (ensaios 23 a 44), a qual pertence ao gênero *Saccharomyces*. Deve-se salientar que se utilizou esta levedura selecionada, em função de apresentar melhor custo ao vinicultor e também ser fortemente utilizada pelos vinicultores do sul para a elaboração de vinhos comuns.

3.2 MEIOS DE CULTIVO

3.2.1 PREPARO DO MEIO SÓLIDO PARA A CONSERVAÇÃO DO MICRORGANISMO

Descreve-se a seguir o procedimento usado para o preparo do meio de cultura sintético, o qual serviu para conservar o microrganismo presente no próprio mosto da uva da variedade Itália, proveniente da Vitivinícola Góes (leveduras selvagens) empregadas nas fermentações realizadas no laboratório do Departamento de Engenharia Química.

Foram preparados 300mL do meio de cultura sintético com a composição descrita na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Componentes e concentração do meio sintético

Componente	Concentração
Agar	20,0 g/L
Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	20,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Cloreto de potássio (KCl)	1,2 g/L
Cloreto de amônio (NH_4Cl)	1,5 g/L
Fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4)	5,0 g/L
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,7 g/L

O preparo do meio sintético consistiu na adição dos componentes (menos o agar que foi adicionado posteriormente) em um recipiente e em seguida adicionou-se 200mL de água destilada. Após a dissolução completa das partes sólidas com auxílio de um bastão de vidro adicionou-se o agar e completou-se o volume de 300mL com água destilada.

Em seguida, aqueceu-se o recipiente no microondas até que a solução entrasse em ebulição; após, com auxílio do bastão de vidro agitou-se a solução. Esse procedimento foi repetido até que a solução tornasse límpida.

Parte do meio sintético preparado foi distribuída em 10 tubos de ensaio, os quais receberam 10mL. Posteriormente, esses tubos foram fechados com um tampão. Após o devido preparo, os dez tubos de ensaio foram autoclavados a 121°C por 15 min (autoclave vertical Modelo 103 da Fabbe Primar).

Depois de serem autoclavados, os dez tubos foram posicionados de forma que ficassem inclinados, para que o meio sintético no interior de cada tubo se solidificasse na forma desejada, aumentando assim a sua área superficial de contato.

3.2.2 PREPARO DO MOSTO

Em todos os ensaios, foi utilizado o mosto de uva da variedade Itália (Figura 3.1) proveniente da cidade de São Miguel Arcanjo (SP), obtido nas dependências da Vitivinícola Góes (São Roque – SP).



Figura 3.1 – Foto da uva Itália

Para a coleta do mosto utilizado nos ensaios na presença de casca adotou-se o seguinte procedimento: após a uva ter sofrido o processo de separação do engaço e posterior esmagamento, adicionou-se 200mg de metabissulfito de potássio por litro de mosto para inibir os microrganismos indesejáveis, e a mistura resultante permaneceu em repouso por 3 horas sem ocorrência de fermentação. Após esse período, o mosto foi transferido para recipientes e submetido a congelamento para posterior utilização nos ensaios realizados em São Carlos.

No caso da coleta do meio de cultivo para os ensaios na ausência de casca, o procedimento adotado foi o seguinte: após a uva ter sofrido o processo de separação do engaço e posterior esmagamento, o mosto permaneceu em repouso sob a ação de 250mg/L de metabissulfito de potássio por 24 horas, tempo necessário para que a separação das cascas por flotação se processasse sem ocorrência de fermentação. Após a separação estar concluída, o mosto isento de casca foi bombeado para outra dorna, distribuído para recipientes e submetido a congelamento para posterior utilização nos ensaios realizados em São Carlos.

3.2.3 PREPARO DO MEIO PARA REATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS SELVAGENS E SELECIONADAS

Para a reativação das leveduras selvagens e selecionadas foi utilizado o mosto de uva Itália filtrado em um filtro de pano, tendo a composição descrita na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Composição do meio natural para a reativação

Componente	Quantidade	Composição
Suco de uva	1L	-----
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	50g	50g/L de suco de uva
Metabissulfito de potássio (K ₂ S ₂ O ₅)	200mg	200mg/L de suco de uva

Como a concentração de sólidos solúveis no mosto de uva da variedade Itália foi de 13,5°Brix, antes do início de cada reativação promoveu-se a correção na concentração de açúcar do mosto (chaptalização), por meio da adição de 50g de açúcar cristal por litro de mosto. Deve-se salientar que a chaptalização promovida respeitou a restrição de que 70% de todo o etanol presente no vinho tem que ser originado a partir do açúcar existente na uva.

Finalmente, foi promovida a correção do pH (medidor de pH Q-400.M.2 da Quimis®) para o valor de 3,4 por meio de adição de carbonato de cálcio ou de ácido tartárico.

3.2.4 PREPARO DO MEIO PARA AS FERMENTAÇÕES

Inicialmente, promoveu-se o descongelamento dos mostos coletados na Vitivinícola Góes, descritos no item 3.2.2.

Após promover a chaptalização, por meio de 50g/L de açúcar cristal, foi promovida a correção do pH para o valor predeterminado pelo planejamento fatorial, por meio de adição de carbonato de cálcio ou de ácido tartárico.

Deve-se ressaltar que os ensaios com casca continham aproximadamente 100g de casca por litro de meio, pois o peso total das bagas é formado por 6% a 12% de casca, de 2% a 5% de semente e de 85% a 92% de polpa (HASHIZUME, 2001). Outra diferença importante é quanto à quantidade de $K_2S_2O_5$ presente no mosto, já que nos ensaios com casca foi sulfitado com 200mg/L, enquanto que para a preparação do mosto sem casca foram adicionados 250mg/L de $K_2S_2O_5$, conforme descrito no item 3.2.2.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

É importante salientar que as fermentações foram conduzidas de forma a reproduzir as condições empregadas pela Vitivinícola Góes, tanto no preparo do meio de fermentação quanto no preparo do inóculo.

3.3.1 CONSERVAÇÃO E PREPARO DA CULTURA ESTOQUE

Na Vitivinícola Góes, de um tanque em fermentação turbulenta transferiu-se os microrganismos com auxílio de uma alça do caldo fermentativo para os tubos inclinados, contendo o meio descrito na Tabela 3.1. Após receberem os microrganismos, os tubos inclinados foram incubados por três dias à temperatura ambiente. Transcorrido esse período, observou-se a formação de uma camada de células cobrindo a superfície do meio sólido. Adicionou-se então 18mL de glicerol, o qual havia sido previamente esterilizado, em cada um dos dez tubos inclinados.

Após receberem o glicerol, os tubos estoque foram guardados na geladeira e usados posteriormente nos experimentos de fermentação com leveduras selvagens.

3.3.2 DESCRIÇÃO DE UM ENSAIO TÍPICO

No presente item descreve-se o procedimento que foi utilizado para execução das fermentações realizadas no Laboratório da Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Já o procedimento que é empregado pela Vinícola Góes será detalhado no item 3.5.

3.3.2.1 Reativação das Leveduras selvagens

Primeiramente, foram preparados 3 tubos inclinados contendo 10mL do meio sintético descrito na Tabela 3.1, segundo o mesmo procedimento já relatado no item 3.1.

Na câmara asséptica, transferiu-se as leveduras de um tubo estoque para os três tubos inclinados preparados anteriormente.

Depois de receberem os microrganismos, os tubos inclinados foram levados para a incubação a 25°C por três dias (Incubadora Refrigerada com Agitação TE-422 da Tecnal). Após esse período, as células foram re-suspendidas em 20mL de mosto filtrado e transferidas para um frasco tipo Erlenmeyer 250mL, contendo 180mL do mosto filtrado, cuja composição está apresentada na Tabela 3.2.

Após receber as células, o Erlenmeyer contendo 200mL de inóculo foi levado para incubação a uma rotação de 250rpm e uma temperatura de 24°C. Quando se obteve uma concentração de aproximadamente 10^7 células/mL, verificada por contagem em câmara de Neubauer, 50mL do inóculo reativado foi transferido para os 950mL de mostos a serem fermentados. De acordo com PATO (1998), a fração de 5% de mosto em plena fermentação é a ideal para se iniciar a fermentação, como o mosto em plena fermentação apresenta 8×10^6 células/mL a $1,210^7$ células/mL (HASHIZUME, 2001)., adotou-se a concentração de 10^7 células/mL com ideal.

3.3.2.2 Reativação das Leveduras Seleccionadas

O inóculo foi preparado transferindo-se 0,125g da levedura selecionada seca e ativa Mauriferm® Y-904 da COATEC para 200mL do mosto filtrado, chaptalizado e com pH de 3,4 (Tabela 3.2), contido em um Erlenmeyer 250mL. Após o mosto ter recebido as leveduras, o Erlenmeyer foi levado para incubação numa rotação de 250rpm e temperatura de 28°C até se obter uma concentração de aproximadamente 10^7 células/mL, verificada por contagem em câmara de Neubauer.

3.3.2.3 Ensaios Fermentativos

Os experimentos foram planejados e executados segundo o Método de Análise por Superfície de Resposta, o qual é baseado no planejamento fatorial 2^n expandido, sendo n igual ao número de variáveis, e estabelece uma relação funcional entre a resposta e os fatores (BARROS *et al.*, 2002). A codificação das variáveis independentes nos níveis desejados foi realizada de acordo com metodologia proposta por Myers (1976).

Assim para os ensaios do planejamento fatorial, escolheu-se os valores 20°C e 28°C para a temperatura e para o pH inicial os valores de 3 e 3,6. A execução do planejamento 2^2 consiste em realizar ensaios e registrar as respostas observadas em todas as possíveis combinações dos valores: (20°C, 3), (20°C, 3,6), (28°C, 3) e (28°C, 3,6). A listagem dessas combinações, a qual é chamada de *matriz de planejamentos*, é apresentada na Tabela 3.3. Além disso, essa tabela também apresenta os ensaios correspondentes a triplicagem no ponto central, que no presente trabalho corresponde aos valores de 24°C para a temperatura e 3,3 para o pH.

A Tabela 3.3 mostra ainda as quatro combinações de pH e temperatura provenientes do *planejamento em estrela* (BARROS *et al.*, 2002) (ensaios 8 a 11).

Assim usando a Equação 2.4, tem-se que os valores de x_1 e x_2 apresentados na Tabela 3.3 foram obtidos pelas seguintes equações: $x_1 = \frac{T - 24}{4}$ e $x_2 = \frac{pH - 3,3}{0,3}$.

Deste modo, segundo a metodologia proposta para a realização do planejamento fatorial com duas variáveis (pH inicial e temperatura) em dois níveis, foram realizados 4 ensaios correspondentes às combinações 2 a 2 de variáveis e níveis (ensaios 1 a 4, na Tabela 2.3), complementados por 3 ensaios no ponto central (ensaios 5 a 7). Para a expansão em estrela são necessários mais 4 ensaios (8 a 11), totalizando 11 ensaios com o meio de cultivo isento de cascas e mais 11 ensaios com meio de cultivo contendo cascas resultando, assim em 22 fermentações utilizando leveduras selvagens e 22 utilizando leveduras selecionadas.

Esses 44 ensaios foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (Figura 3.4), utilizando 3 reatores, de construção caseira, com 1,2L de capacidade cada, constituídos por 3 frascos tipo kettle com tampas de aço inox, dotados de um sistema para controle de temperatura (BADINO JUNIOR e HOKKA, 1999).

Tabela 3.3 – Planejamento fatorial 2^2 com ponto central e sua ampliação através do planejamento em estrela para estudar o efeito do pH inicial e da temperatura.

Ensaio	pH	Temperatura	x_1	x_2
1	3	20	-1	-1
2	3	28	-1	1
3	3,6	20	1	-1
4	3,6	28	1	1
5	3,3	24	0	0
6	3,3	24	0	0
7	3,3	24	0	0
8	3,8	24	$\sqrt{2}$	0
9	3,3	30	0	$\sqrt{2}$
10	2,8	24	$-\sqrt{2}$	0
11	3,3	18	0	$-\sqrt{2}$

Todos os ensaios foram iniciados transferindo-se 50mL de inóculo reativado (itens 3.3.2.1 ou 3.3.2.2) para 950mL de meio de cultivo, o qual foi anteriormente chaptalizado e submetido à correção de pH. Convém ressaltar ainda que a proporção de inóculo adicionada é similar à fração de pé de cuba empregada na Vinícola Góes, que também está em torno de 5%.

Durante a realização dos ensaios foram coletadas amostras de 10mL aproximadamente, para acompanhamento do crescimento celular, consumo dos açúcares redutores totais, produção de etanol e glicerol.

Feita a coleta, utilizou-se 1mL para a contagem de células e o restante da amostra para a determinação do pH, seguida por centrifugação (Centrifuga Excelsa® II Modelo 206/MP da Fanem®). O sobrenadante foi então transferido para pequenos frascos e congelado, para posteriormente serem realizadas as análises de concentração de açúcares redutores totais, etanol, glicerol e acidez volátil.



Figura 3.4 – Fermentadores utilizados nos 44 ensaios

Transcorridas 72 horas de fermentação, o vinho que estava no reator foi descubado (separado do bagaço e do depósito formado). Após 20 dias promoveu-se a primeira trasfega (separação do vinho da borra), e, decorridos mais 30 dias, promoveu-se outra trasfega. Após essa segunda trasfega, o vinho foi filtrado sob vácuo em um frasco tipo Kitassato. Terminada a filtração, o vinho foi armazenado em garrafas de 500mL, sendo que amostras deste último foram coletadas e congeladas, e posteriormente submetidas a análises para a determinação da concentração de etanol, glicerol e acidez volátil no vinho final.

A Figura 3.5 tem a finalidade de facilitar a compreensão do procedimento realizado na preparação das fermentações.

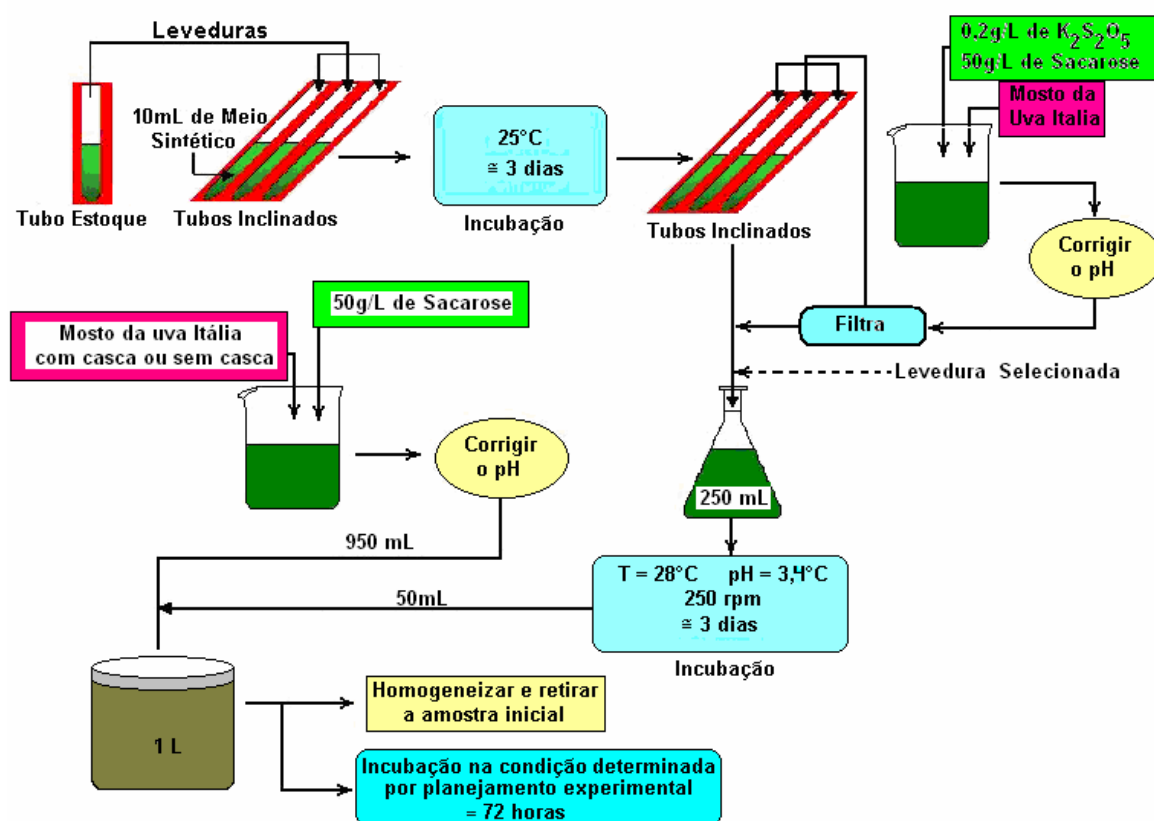


Figura 3.5 – Esquema do procedimento empregado na preparação das fermentações

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (A.R.T.)

Para a determinação da concentração de açúcares redutores totais foi utilizado o método colorimétrico envolvendo a reação da extremidade redutora do açúcar com o reagente ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A preparação das amostras para a análise envolveu as seguintes etapas: preparação do reagente DNS; hidrólise das amostras, diluição das amostras hidrolisadas e reação com o reagente DNS, as quais são descritas a seguir.

3.4.1.1 Preparo do Reagente DNS

O reagente deve ser preparado em um Becker de 500mL, mantendo-o um banho à $\pm 45^{\circ}\text{C}$. Dissolve-se completamente 30g de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e potássio) em 50mL de água destilada.

Adiciona-se em seguida 1g de 3-5 ácido dinitrossalicílico (DNS) á solução anterior. E finalmente adiciona-se 20mL de NaOH 2N (8,3g em 100mL de H₂O destilada), misturando sempre até que a dissolução dos sólidos presentes seja completa.

Transfere-se quantitativamente a solução obtida para um balão volumétrico de 100mL. Coloca-se este balão em um banho de água a temperatura ambiente por ± 2 horas para ser resfriado. Por fim ajusta-se o volume do balão para 100mL com água destilada.

3.4.1.2 Hidrólise

O procedimento adotado é adequado apenas para mostos hidrolisados ou quando se deseja analisar apenas os açúcares redutores (A.R.) já existentes na mistura. Porém, quando se pretende determinar a concentração de açúcares redutores totais (A.R.T.) uma etapa anterior se faz necessária. Isso é relevante visto que a sacarose é um dissacarídeo não redutor. Esta etapa, conhecida como hidrólise foi realizada pelo método proposto por FALCONE e MARQUES (1965), o qual é descrito a seguir:

- Em um balão de volume adequado pipeta-se 5mL de HCl 0,9N (76,5mL de HCl concentrado em 1L de H₂O destilada) e adiciona-se 5mL de amostra isenta de células. Esta amostra não pode conter mais que 600g/L de A.R;
- Mistura-se e leva a um banho maria a 75°C (Banho GP-200 Neslab), onde o balão é mantido por 30 minutos;
- Resfria-se rapidamente em um banho de água com gelo.

Após a hidrólise neutralizou-se a solução com NaOH para se determinar o A.R.T. pelo método DNS.

Considerando que o mosto de uva possui praticamente apenas açúcares redutores (glicose e frutose) e ainda que a sacarose adicionada seria rapidamente convertida em glicose e frutose pela ação da enzima invertase produzida pelas

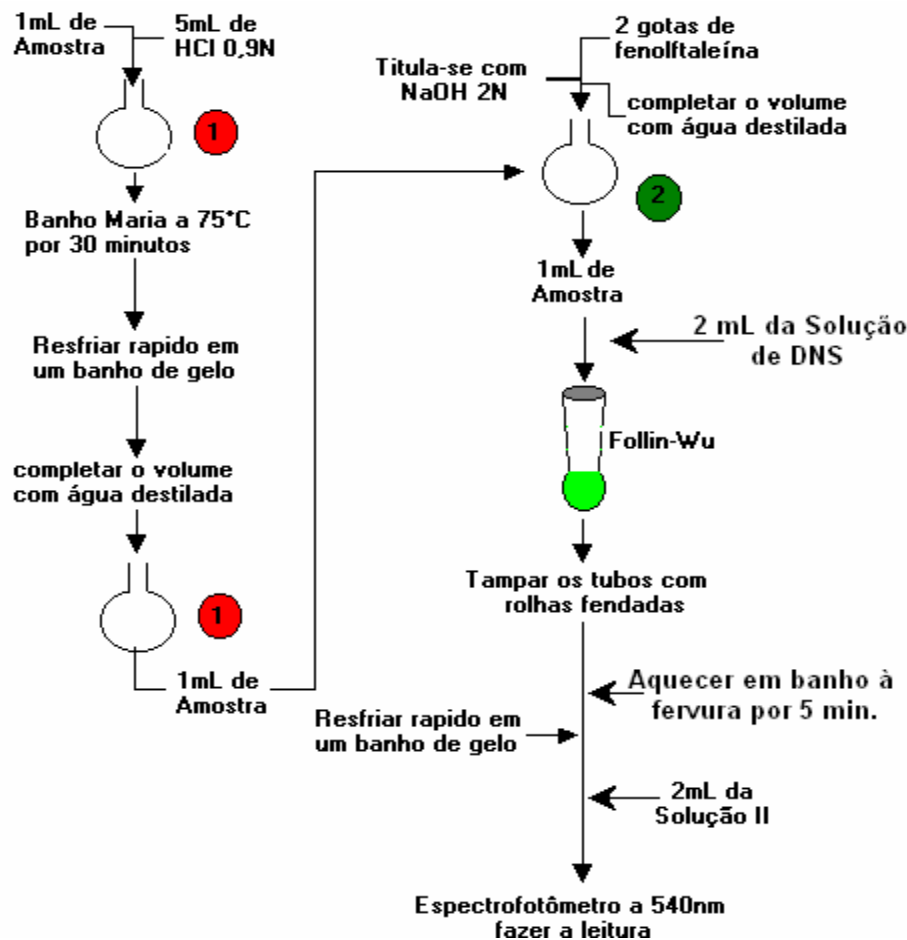
leveduras, não teria sido necessário empregar o procedimento de hidrólise em todas as amostras. Apesar das considerações anteriores, por segurança, todas as amostras coletadas durante os experimentos foram hidrolisadas. Somente as amostras do vinho final foram submetidas diretamente à análise de A.R. sem sofrer hidrólise.

3.4.1.3 Análise de A.R pelo método DNS.

Essa análise foi realizada através do método DNS. O método exige a preparação de uma curva de calibração com soluções padrões de açúcares redutores de 0,1 a 1,5g/L e é constituído do seguinte procedimento:

- Para um tubo de Follin-Wu de 25mL transferi-se 1mL da mistura de A.R., a qual foi adequadamente diluída anteriormente;
- Adiciona-se 2mL da solução de DNS no tubo de Follin-Wu;
- Aquece-se o tubo de Follin-Wu por 5 minutos em água em ebulição e em seguida resfria-se o mesmo em água gelada, mantendo o tubo tampado com uma rolha fendida;
- Completa-se o volume do tubo até 25mL com água destilada, homogeneiza-se bem e determina-se a absorbância no espectrofotômetro;
- Deve-se, antes de fazer as leituras das amostras, ajustar o zero do espectrofotômetro com o branco;
- A leitura deve ser realizada a 540nm (visível) (espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro da Amersham pharmacia biotech) e com amostra tendo uma concentração de A.R. de 0,1 a 1,5g/L.

A Figura 3.2 ilustra de maneira esquemática o procedimento de hidrólise e de determinação da concentração de açúcares redutores totais pelo do Método de DNS.



Obs.: Não esquecer de preparar o BRANCO

Figura 3.2 – Representação esquemática do procedimento de (1) hidrólise e (2) da dosagem da concentração de açúcares redutores totais pelo Método DNS.

3.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

Para a determinação do número de células utilizou-se o método de contagem direta com a Câmara de Neubauer.

Para viabilizar a contagem, as amostras devem ser adequadamente diluídas, transferindo-se 1 mL de meio fermentativo coletado para tubos de ensaios previamente preparados com 9 mL de solução salina 0,9% (m/V). Destes novos tubos transferiu-se, novamente, 1 mL da mistura para outros tubos de ensaios, que também continham 9 mL de solução salina 0,9%, totalizando uma diluição de 1/100 da amostra quando necessário.

A câmara de Neubauer consiste em uma quadriculação micrométrica exata sobre um porta objeto. O quadrado formado por 5 quadrantes, sendo 4 angulares e 1 central. Os quadrados angulares se subdividem em 16 cubos pequenos, já o

central em 25 (cada um contendo 16 cubos menores). Cada quadrante contém uma área de 1mm^2 e a profundidade de cada cubo é de $0,1\text{mm}^2$, portanto o volume de cada quadrante é de $0,1\text{mm}^3$.

Utilizou-se o quadrante central para a contagem do número de células nesse trabalho.

Para a contagem além do preparo de amostras devidamente diluídas antes de se levar a câmara de Neubauer para o microscópio (Q-106-2 da Quimis®), tomou-se primeiramente o cuidado de se empregar a câmara e a lamínula perfeitamente limpas. Em seguida se colocou a lamínula sobre a câmara e com uma micropipeta adicionou-se a amostra a câmara tocando a ponta da micropipeta entre a extremidade da lamínula e o porta objeto que contem a câmara. O líquido preencheu a câmara por capilaridade. O volume não deve ser maior que o correspondente, pois levantaria a lamínula introduzindo erros na contagem, por isso se tomou as seguintes precauções:

- O líquido encheu total ou quase totalmente o espaço debaixo da lamínula;
- O líquido não escorreu no canal transversal;
- Verificou-se que não existia nenhuma bolha de ar.

Para se determinar a concentração de células na suspensão, ou seja, o número de células por mL de solução, utilizou-se a Equação (3.1).

$$\text{Conc.}_{\text{CÉLULAS}} = \frac{N^{\circ} \text{ médio de células contadas} \cdot 25 \cdot \text{Diluição}}{0,1\text{mm}^3} \cdot \frac{1000\text{mm}^3}{1\text{mL}} \quad (3.1)$$

Onde 25 é o número cubos presentes no quadrante central e $0,1\text{mm}^3$ é o volume desse quadrante.

Para a determinação da concentração celular em g/L (X) usando o método da contagem de células na câmara de Neubauer, utilizou-se uma correlação entre o número de leveduras e sua massa. Essa correlação é dada pela Equação 3.2 (GÓES, 2003).

$$X = 1,195 \cdot 10^{-8} \cdot \text{Conc.}_{\text{CÉLULAS}} [\text{n}^{\circ}/\text{mL}] \quad (3.2)$$

Onde a **Conc.**_{células} é determinada utilizando a câmara de Neubauer.

3.4.3 ANÁLISES DO ETANOL E GLICEROL

As análises de etanol e glicerol foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O equipamento empregado nessas análises foi fabricado por Waters Chromatography Division – Millipore Co., e é constituído de um injetor manual tipo Rheodyne[®] de 20µl, duas bombas de pistão, controlador de temperatura da coluna e um refratômetro diferencial.

Foi empregada a coluna do tipo troca iônica, modelo Ionpak[®] KS_G, da marca Shodex[®], fabricada por Showa-Denko K.K. As condições de análise foram as seguintes (TROVATI, 2001).

- Vazão da fase móvel: 1,00 mL/min;
- Fase móvel: Água de ultra-pureza (milli-Q);
- Temperatura da coluna: 80,0°C;
- Temperatura interna do refratômetro: 34,0°C;
- Tempo de análise: 15 minutos.

Antes da análise das amostras coletadas nos experimentos, construiu-se uma curva padrão para cada componente injetando-se soluções de glicerol e etanol com concentrações conhecidas.

Além disso, antes de serem injetadas, as amostras foram ainda diluídas para que as concentrações ficassem na faixa desejada (0,1 a 1,5 g/L) e filtradas em membrana PVDF (fluoreto polivinidileno hidrofílico) de 0,45 µm. Todo o sistema de análise e aquisição está acoplado a um microcomputador, o qual é capaz de processar os cromatogramas e fornecer os resultados das análises. Um exemplo de cromatograma para essa análise é encontrado na Figura 3.3.

Pela Figura 3.3 nota-se que a coluna utilizada é capaz de separar adequadamente sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol. Porém, como a análise foi realizada com o intuito de determinar a concentração de etanol e glicerol na amostra, não houve a separação adequada da glicose e frutose, e os valores medidos pelo HPLC não foram confiáveis. A dificuldade em separar adequadamente a glicose e a frutose se deve à ausência de diluição, pois nas primeiras amostras não houve diluição, devido à baixa concentração de etanol e glicerol presentes nas amostras.

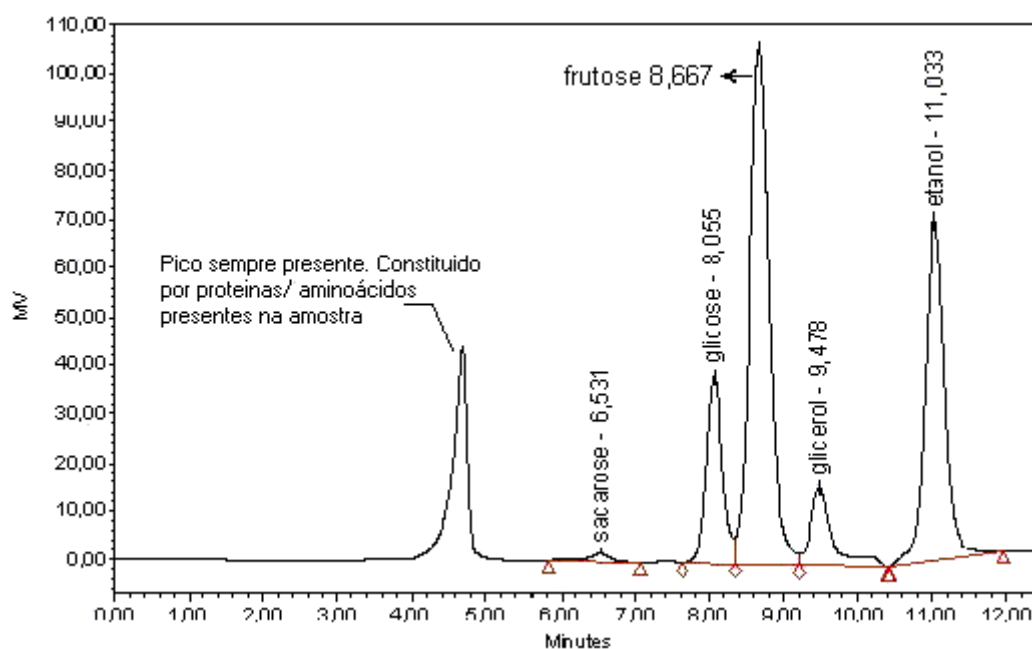


Figura 3.3 – Cromatograma ilustrando os diversos componentes de uma amostra, com seus respectivos picos e tempos de retenção

3.4.4 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ VOLÁTIL.

Para essa análise foi empregado o método Cazenave-Ferré (MORETTO *et al.*, 1988).

O método Cazenave-Ferré segue o seguinte procedimento.

Pipeta-se 10mL da amostra no borbulhador e 250mL de água destilada no gerador de vapor do aparelho de destilação. Leva-se a água destilada à ebulição com a torneira de vapor aberta, a fim de eliminar o ar do aparelho e eventualmente o gás carbônico retido na água destilada. Em seguida fecha-se a torneira de vapor e coloca-se o borbulhador em contato com a água destilada em ebulição, para que o vapor de água borbulhe na amostra arrastando os ácidos voláteis. Recolhe-se 100mL de destilado. Titula-se a acidez volátil do destilado com a solução de hidróxido de sódio 0,1N (0,1mol/L), em presença de fenolftaleína.

Supondo que se gaste “*n*” mL de hidróxido de sódio 1N para titular o destilado, pode-se determinar a concentração de acidez volátil expressa em g/L de ácido acético (CH₃COOH) pela Equação 3.3. Essa equação é encontrada sabendo que a massa molar do CH₃COOH é de 60g/mol e que 1mol de NaOH neutraliza 1mol de ácido acético.

$$Conc._{\text{Ác.Vol}} = n(\text{mL gasto}) \cdot \frac{0,1\text{molNaOH}}{L} \cdot \frac{1\text{molC}_2\text{H}_4\text{O}_2}{1\text{molNaOH}} \cdot \frac{60\text{gC}_2\text{H}_4\text{O}_2}{1\text{molC}_2\text{H}_4\text{O}_2}$$

$$Conc._{\text{Ác.Vol}} = 6 \cdot n \quad (3.3)$$

3.5 PROCEDIMENTO EMPREGADO NA VINÍCOLA GÓES PARA A PRODUÇÃO DE VINHO

Além dos 44 ensaios de bancada, foram realizados também mais 4 ensaios com 1000L cada, na Vitivinícola Góes, para efeito de comparação com os resultados obtidos no laboratório do DEQ-UFSCar e principalmente para verificar a aplicabilidade das alterações propostas na prática.

3.5.1 PROCEDIMENTO TRADICIONAL

O procedimento empregado pela Vitivinícola Góes para a produção de vinho é descrito a seguir e ilustrado na Figura 3.6 por meio de um esquema simplificado.

Deve-se salientar que esse procedimento foi o mesmo empregado para o experimento realizado na vinícola na presença de casca e utilizando levedura selvagem.

3.5.1.1 Colheita ou Vindima

Como citado anteriormente, a uva Itália utilizada pela Vinícola Góes é comprada, em quase sua totalidade, dos viticultores de São Miguel Arcanjo, os quais colhem as uvas e as põem em caixas plásticas. Depois, as caixas plásticas são transportadas cobertas por lona em caminhões até a vinícola.

Segundo o enólogo responsável da Vinícola Góes, nas safras de 2002, 2003 e 2004, foram esmagadas pela vinícola em cada safra uma média de 200 mil quilos de uva da variedade Itália. Essa quantidade de uva produziu por ano aproximadamente 150 mil litros de vinho.

As uvas que chegam na Vinícola Góes são pesadas e logo em seguida esmagadas. Concomitantemente ao esmagamento das uvas, promove-se a lavagem das caixas plásticas usadas no transporte.

3.5.1.2 Esmagamento

Esta operação tem por objetivo amassar as uvas com finalidade de liberar todo o mosto do grão. Na Vinícola Góes o esmagamento das uvas é promovido de maneira mecânica por uma Desengaçadeira centrífuga e *Esmagadora de cilindros*.

Paralelamente ao esmagamento, o mosto é bombeado para os tanques de fermentação, que geralmente têm capacidade de 17 mil litros, até que se obtenha aproximadamente 14 mil litros de mosto.

É importante salientar que na Vinícola Góes a produção do vinho branco é realizada pela vinificação em tinto, ou seja, a fermentação turbulenta ocorre na presença da casca.

3.5.1.3 Mosto

Após o volume do mosto atingir aproximadamente 14 mil litros no tanque de fermentação, promove-se a análise para determinar a concentração de açúcar. Em seguida, faz-se a correção do açúcar, geralmente, com 50 gramas de açúcar por litro de mosto e adiciona-se 0,2 gramas de metabissulfito de potássio por quilo de mosto. Depois de receber essas substâncias e de sofrer uma homogeneização, o mosto fica em repouso por aproximadamente 3 horas. Transcorridas as 3 horas, adiciona-se aproximadamente 700 litros de inóculo, o qual é proveniente de outro tanque aonde a fermentação se encontra na fase turbulenta.

3.5.1.4 Fermentação Turbulenta

Esta etapa inicia-se quando o mosto recebe o inóculo e termina após aproximadamente três dias, período necessário para a densidade do vinho atingir um valor entre 1010 e 1015 g/L. É nessa etapa que ocorre a maior formação de etanol e CO₂, o qual na Vinícola Góes, como na maioria das vinícolas existentes, é liberado diretamente para a atmosfera. Após 36 horas da adição do inóculo promove-se a remontagem, ou seja, uma homogeneização, através de uma bomba que injeta ar no mosto.

3.5.1.5 Descube

Na Vinícola Góes se promove o descube após se verificar através de um densímetro que a densidade do vinho está entre 1010 e 1015 g/L. Essa etapa do processo consiste em promover a separação do “vinho” das partes sólidas (cascas, sementes, etc.) através do bombeamento desse líquido (decantado) para um outro

tanque de fermentação, que na vinícola em estudo tem a capacidade de 100 mil litros.

Após a transferência do vinho, resta no tanque onde ocorreu a fermentação turbulenta essencialmente cascas e as sementes das uvas. Essa porção sólida ainda contém uma grande quantidade de vinho. Por esse motivo, na Vinícola Góes é realizada a prensagem em uma prensa mecânica e o líquido extraído é bombeado para um distinto tanque de 100 mil litros e imediatamente corrigida a concentração de anidrido sulfuroso. Já a massa sólida é utilizada como adubo nas plantações da própria vinícola.

3.5.1.6 Fermentação Lenta

Essa etapa na Vinícola Góes ocorre nos tanques de 100 mil litros por um período de 2 a 4 semanas aproximadamente. Esse período é o tempo geralmente necessário para que se observe o fim da fermentação.

3.5.1.7 Trasega

Depois de terminada a fermentação, promove-se a operação denominada na prática de trasega, que consiste em separar o vinho da borra (partículas sólidas que se depositaram naturalmente no período que transcorria a fermentação lenta).

O vinho praticamente livre das partículas sólidas é bombeado para outro reservatório de 100 mil litros e a borra é utilizada como adubo nas plantações da própria vinícola. Nos novos tanques, o vinho é novamente analisado para se determinar o SO_2 livre e se promover uma correção com metabissulfito de potássio para que sua concentração assuma um valor próximo de 60mg/L.

Transcorridos 30 dias da primeira trasega se promove a segunda trasega do mesmo modo que foi realizada a primeira. Deve-se salientar que após 15 dias da primeira trasega se promove a clarificação do vinho.

O processo de clarificação na Vinícola Góes é realizado por meio da substância bentonita, na concentração de aproximadamente 0,15g/L. Após receber a bentonita, o vinho fica em repouso por duas semanas e então é novamente separado da nova borra formada. Em seguida o vinho é bombeado para um novo tanque de 100 mil litros, onde se promove uma nova correção da concentração de SO_2 livre para um valor próximo de 60mg/L.

3.5.1.8 Amadurecimento

Nesses novos tanques de 100 mil litros o vinho da uva Itália fica no mínimo quatro meses para que sofra um amadurecimento.

3.5.1.9 Vinho

Finalmente, após ser clarificado, o vinho é filtrado em um filtro folha, o qual utiliza terra de diatomácea como meio filtrante. O filtrado é então bombeado para um novo tanque de 100 mil litros onde aguardará o momento de sofrer as últimas correções e ser engarrafado.

3.5.2 MODIFICAÇÕES DO PROCESSO TRADICIONAL

Para a realização das fermentações sem casca assim como para o uso das leveduras selecionadas foi necessário introduzir modificações no processo tradicionalmente empregado na Viti-Vinicola Góes.

Assim, para a utilização da levedura selecionada, a etapa de ativação das mesmas foi incluída no processo. Na vinícola, a ativação foi realizada aquecendo-se 100L de água até 38°C, seguida pela adição de 5 kg de açúcar cristal. Após a devida dissolução do açúcar adicionou-se 500g da levedura selecionada seca e ativa Mauriferm® Y-904 da COATEC. Assim, substituiu-se o pé-de-cuba proveniente de outra dorna em plena fermentação por 100L de levedura selecionada ativada.

Outra modificação diz respeito à separação da casca, etapa anterior à adição do inóculo, que consiste na adição, neste caso de 250mg/L de $K_2S_2O_5$ para que se possa promover a separação do mosto com o mínimo de fermentação ocorrida. Transcorridos 24 horas da adição do $K_2S_2O_5$, tempo necessário para que a separação das cascas por flotação, o mosto isento de casca foi bombeado para outra dorna e bastante arejado antes de receber o inóculo.

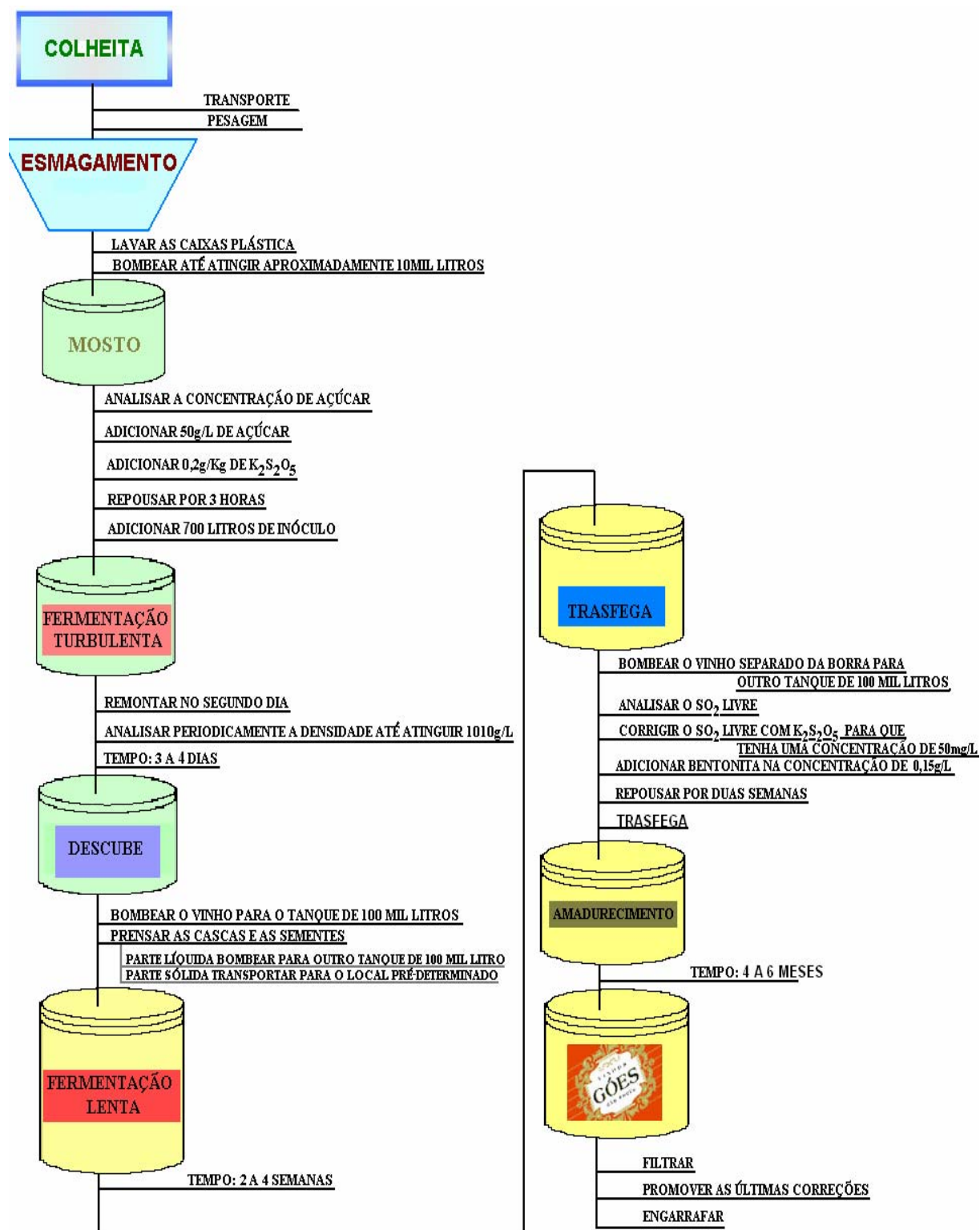


Figura 3.6 – Esquema do procedimento empregado pela Vinícola Góes para a produção de vinho

3.6 CÁLCULO DAS VARIÁVEIS RESPOSTAS

O desempenho da fermentação foi avaliado por meio do cálculo das variáveis respostas produtividade em etanol ($PROD_{Et}$) e rendimento em etanol (η_{Et}), descrito a seguir.

3.6.1 PRODUTIVIDADE EM ETANOL ($PROD_{Et}$)

A produtividade volumétrica de um processo indica a quantidade de um determinado produto que é gerada pela reação, num dado intervalo de tempo e volume de meio fermentativo. Na prática, altos valores de produtividade ocorrem em condições de fermentação que levam à ocorrência de fermentações turbulentas de menor duração, tornando possível a liberação da dorna mais rapidamente e o aumento da capacidade de produção da vinícola em uma determinada safra. Assim sendo, a produtividade em etanol ($PROD_{Et}$), expressa em g/L.h, foi calculada pela Equação 3.4 (TROVATI, 2001).

$$PROD_{Et} = \frac{C_{Et_M} - C_{Et_i}}{t_M} \quad (3.4)$$

onde:

C_{Et_M} = concentração máxima de etanol atingida durante a fermentação turbulenta (g/L) para cada experimento;

C_{Et_i} = concentração inicial de etanol (g/L) em cada experimento;

t_M = tempo no qual a concentração máxima de etanol foi atingida (h).

Em ensaios onde os açúcares redutores totais foram totalmente consumidos antes das 72 horas de fermentação, o valor “máximo” de concentração de etanol foi identificado, por meio de inspeção visual das curvas de formação de etanol em função do tempo, como o ponto experimental localizado no final da fase de intensa produção de etanol (ou no início da fase estacionária), a partir do qual não mais se observou aumento significativo da concentração do mesmo. Neste caso, o valor de t_M coincidiu com o tempo experimental necessário para atingir C_{Et_M} . Para os demais experimentos, nos quais não houve exaustão do substrato antes das 72 horas, adotou-se como concentração “máxima” de etanol o valor atingido ao final do referido período de cultivo e o valor de t_M foi igualado a 72 horas.

3.6.2 RENDIMENTO EM ETANOL (η_{Et})

O rendimento global em etanol com relação ao substrato consumido (η_{Et}) foi definido como a razão entre a concentração máxima de produto formado e a concentração correspondente de substrato consumido, conforme ilustra Equação 3.5, tendo como unidade (g etanol formado/g ART consumido). Esta variável é um importante indicador da conversão do açúcar no produto desejado, ou seja, de quanto a fermentação está sendo benéfica para o vinicultor.

$$\eta_{Et} = \frac{C_{Et_M} - C_{Et_i}}{C_{A.R.T_i} - C_{A.R.T_M}} \quad (3.5)$$

onde:

C_{Et_M} e $C_{A.R.T_M}$ = concentrações de etanol e ART obtidas no tempo t_M (g/L);

C_{Et_i} e $C_{A.R.T_i}$ = concentrações iniciais de etanol e A.R.T. (g/L).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE ETANOL, GLICEROL, CÉLULAS E CONSUMO DE A.R.T. DURANTE OS CULTIVOS

Neste item serão apresentados os resultados obtidos nos 44 experimentos realizados segundo o planejamento fatorial, em termos da produção de etanol, glicerol, células assim como do consumo de A.R.T. (Açúcares Redutores Totais). Esses resultados estão ilustrados nas figuras de 4.1 a 4.44.

É interessante observar que apesar de todos os experimentos terem sido realizados com o mesmo mosto e submetidos à adição da mesma quantidade de açúcar na chaptalização, houve certa diferença nas concentrações iniciais de açúcares redutores totais, a qual oscilou entre 160 e 200 g/L. Isto se deve provavelmente ao fato da dissolução do açúcar, em alguns experimentos, apresentar maior dificuldade. Em alguns casos se notou que a fermentação já havia iniciado ao se promover o descongelamento do mosto, mesmo sem a adição do inóculo, o que poderia justificar também a variação observada.

Analisando as curvas da variação da concentração celular com o tempo, nota-se oscilações nos pontos experimentais em alguns ensaios. Porém, na maioria dos ensaios, a curva de crescimento celular apresenta variações bruscas, embora o consumo de açúcar indique que a fermentação está ocorrendo normalmente (Figuras 4.3, 4.7, 4.9, 4.10, 4.12 a 4.22, 4.25, 4.35 a 4.43). Infelizmente, devido à dificuldade de se conduzir os experimentos na presença de casca assim como devido à impossibilidade de se promover uma homogeneização enérgica, houve durante os experimentos a decantação das leveduras, o que comprometeu a determinação da concentração celular por meio de contagem de células utilizando a câmara de Neubauer. O problema é mais acentuado quando a fermentação diminui de intensidade. Sem a liberação intensa de CO₂, as leveduras decantam mais rapidamente, o que explica a diminuição rápida do número de leveduras presentes no meio. Além disso, a interferência da falta de homogeneização na concentração celular pode ser verificada, na maioria dos ensaios, após 20 horas de fermentação, onde se nota um aumento da mesma. Isso se deve à remontagem do meio fermentativo, a qual era promovida após 20 horas de fermentação, ocasionando uma homogeneização enérgica do meio. Com isso as leveduras que estavam

sedimentadas voltavam para a suspensão e pode-se contar um grande número delas.

Em função da experiência adquirida ao longo de muitos anos sobre a produção de vinho, considera-se uma fermentação normal, na Vinícola Góes, aquela que tem uma duração de 60 a 72 horas. De fato, os experimentos 12, 13, 16, 17, 18, 21 e 30, os quais terminaram entre 60 e 72 horas de fermentação, quase na sua totalidade (com exceção do ensaio 30) foram realizados com levedura selvagem e com casca, condições empregadas pela Vinícola Góes.

Já nos experimentos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 22, 27, 28, 29, 34, 35 e 44, a fermentação não terminou em 72 horas. Nota-se que praticamente todos os ensaios realizados com levedura selvagem e sem casca se enquadram nessa categoria, e portanto, esse comportamento está provavelmente relacionado à alta concentração de $K_2S_2O_5$ empregada nos experimentos sem casca. Porém, com relação aos ensaios 11, 22 e 44, o fator que mais deve ter contribuído para a lentidão do processo fermentativo foi a baixa temperatura ($18^\circ C$), sendo essa a provável explicação também para os ensaios 34 e 35, os quais foram conduzidos a uma temperatura de $20^\circ C$.

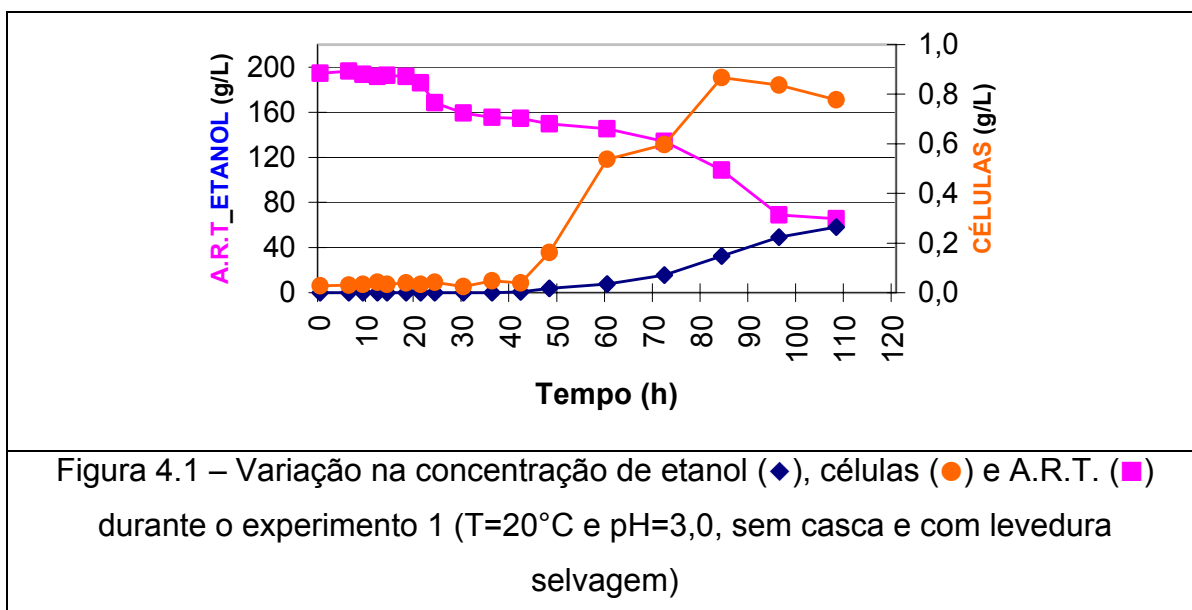
Um fato importante observado nos ensaios 10, 23, 25, 31, 32, 33 e 43 foi a não ocorrência da fermentação no período de 72 horas, em consequência da grande lentidão da fermentação, principalmente quando se empregou alto teor de $K_2S_2O_5$ e baixo pH. Além disso, nota-se também que, com exceção do experimento 10, todos os ensaios foram realizados com levedura selecionada, o que demonstra a maior dificuldade que esta levedura tem para se desenvolver em condições que associam alto teor de $K_2S_2O_5$ e baixo pH.

Entretanto, deve-se destacar que as mesmas leveduras selecionadas quando cultivadas em condições mais favoráveis (pH acima 3,3), apresentaram freqüentemente uma fermentação mais rápida que as selvagens, visto que 8 ensaios inoculados com as leveduras selecionadas terminaram antes das 60 horas (ensaios 26, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42) contra 5 experimentos iniciados com a levedura selvagem (ensaios: 4, 14, 15, 19 e 20). Além da influência da levedura utilizada, nota-se que as temperaturas dos referidos experimentos eram superiores a $24^\circ C$. A diminuição do tempo de fermentação alcançada em alguns experimentos é significativa, pois possibilitaria a antecipação do descube e do final da batelada em períodos que variam entre 12 e 24 horas. Com isso, a dorna ficaria liberada mais

rapidamente para receber novo carregamento de mosto, levando a um aumento de produtividade.

Outro fato que se pode notar nos experimentos que terminaram antes das 60 horas de fermentação, é que no momento em que a concentração de substrato se aproxima de zero (por volta das 50 horas de experimento), o processo de formação de etanol e glicerol entra na fase de desaceleração.

Observando os gráficos ilustrados nas Figuras 4.23 a 4.44, nota-se claramente que tanto o etanol quanto o glicerol são metabólicos primários, apresentando um perfil muito semelhante e que acompanha o aumento da concentração de células. Infelizmente devido à dificuldade de análise e também ao pequeno volume de amostra coletado, nos 22 ensaios iniciais não se pôde determinar a concentração de glicerol nas amostras com precisão, por isso que essa variável não foi incluída nas Figuras 4.1 a 4.22.



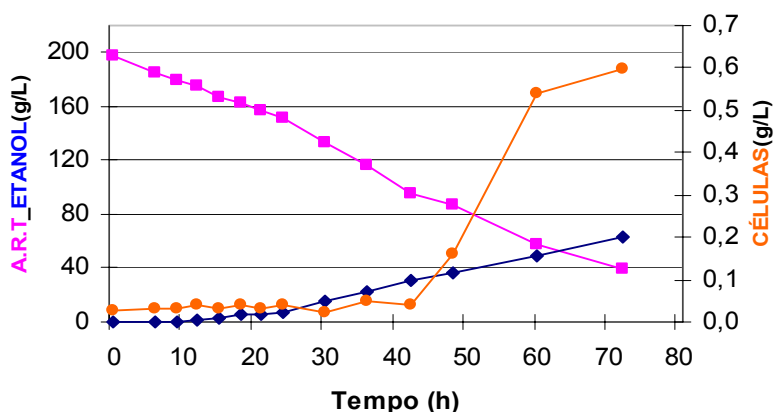


Figura 4.2 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 2 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, sem casca e com levedura selvagem)

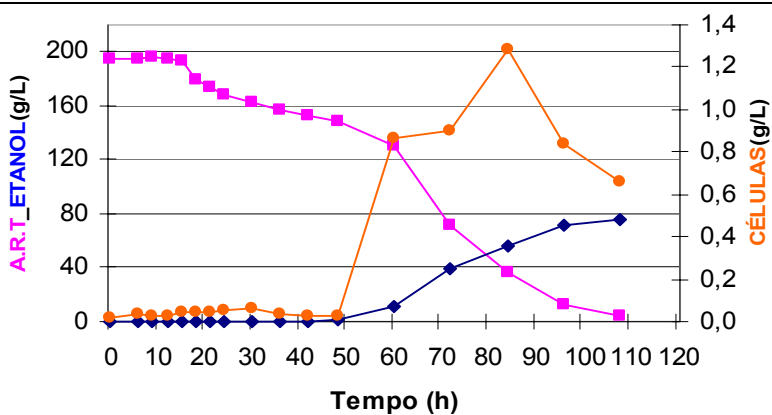


Figura 4.3 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 3 ($T=28^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,0$, sem casca e com levedura selvagem)

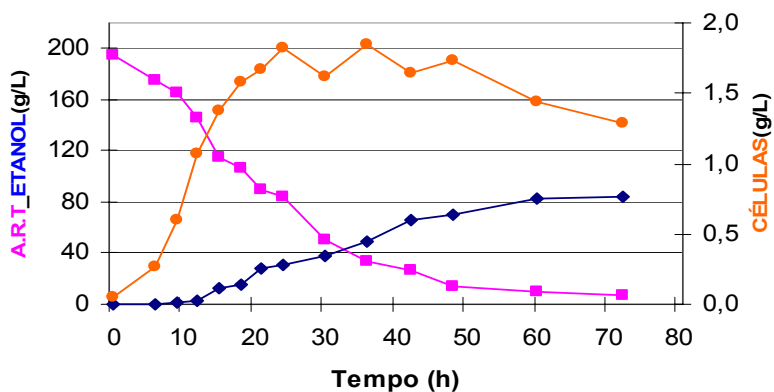


Figura 4.4 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 4 ($T=28^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, sem casca e com levedura selvagem).

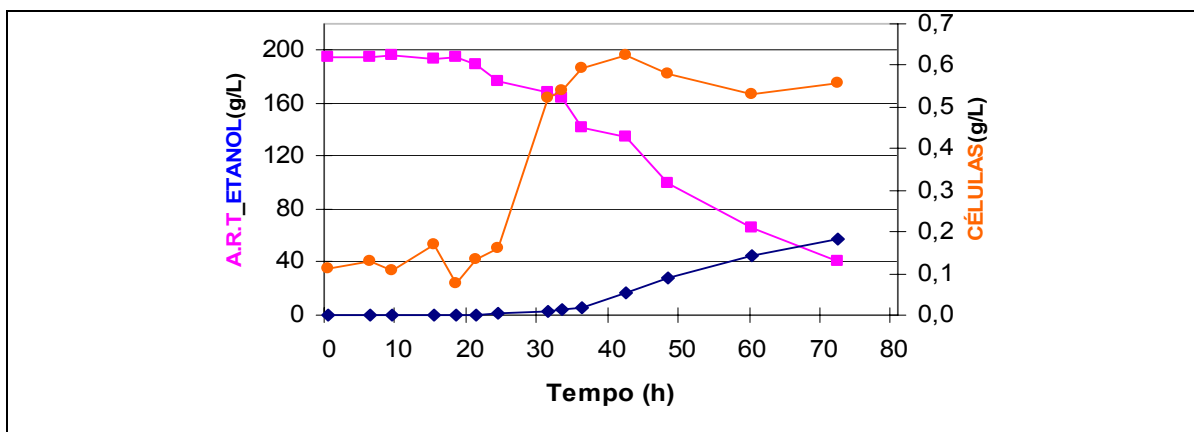


Figura 4.5 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 5 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)

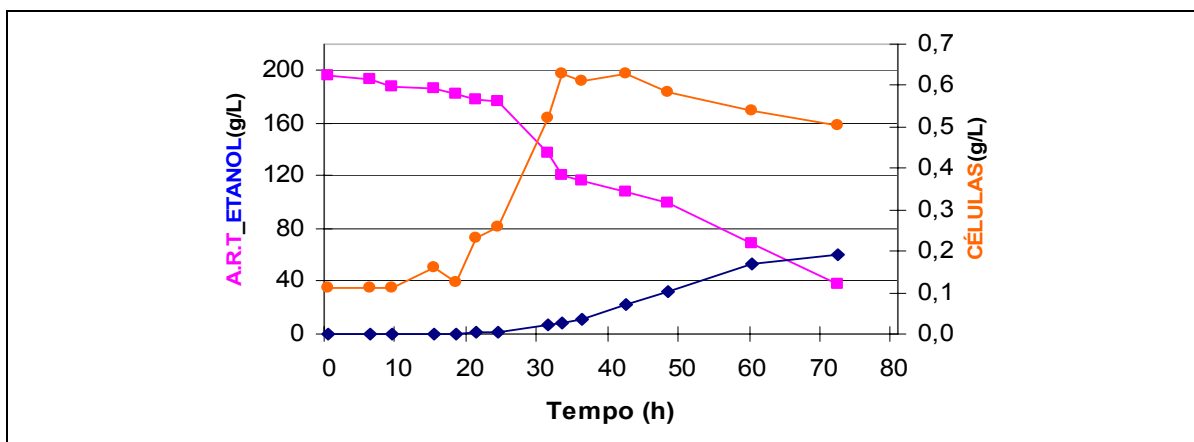


Figura 4.6 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 6 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)

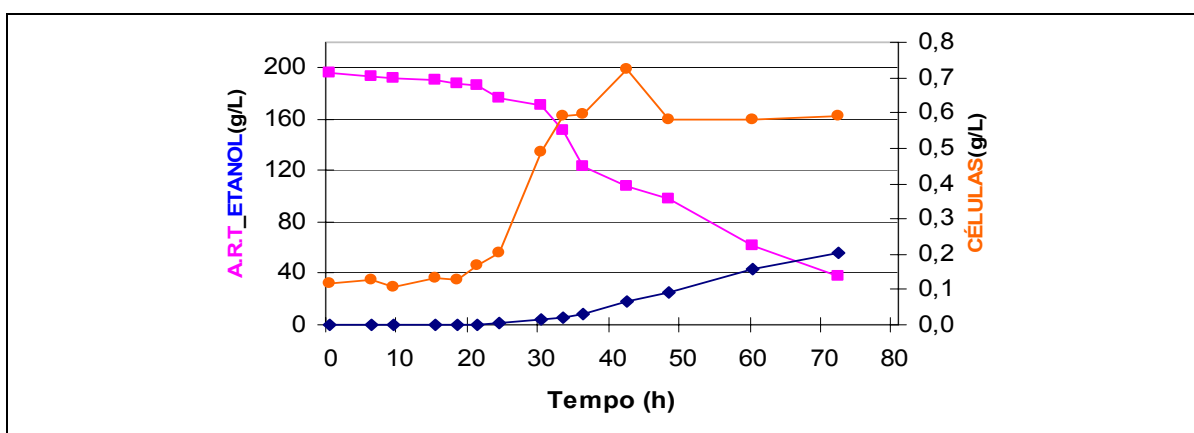


Figura 4.7 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 7 (T=24°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)

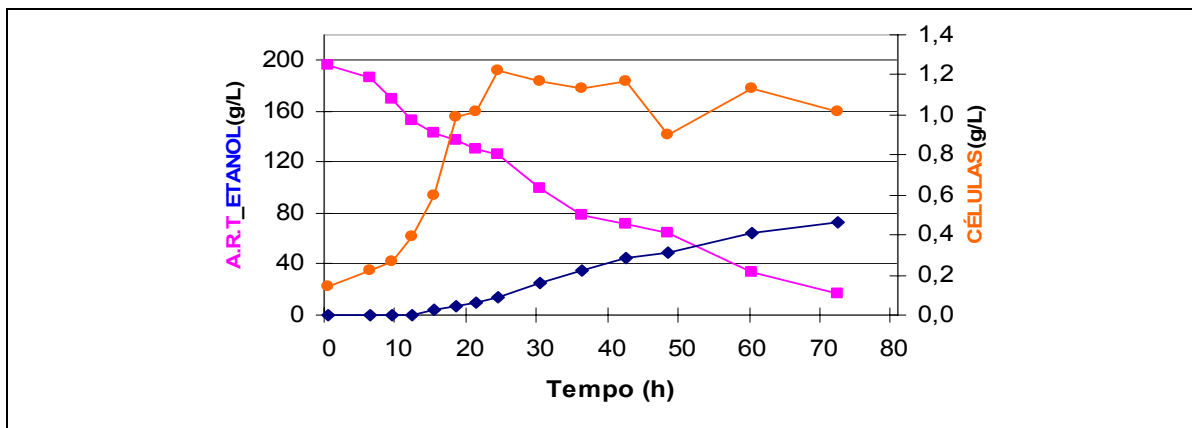


Figura 4.8 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 8 (T=24°C e pH=3,8, sem casca e com levedura selvagem)

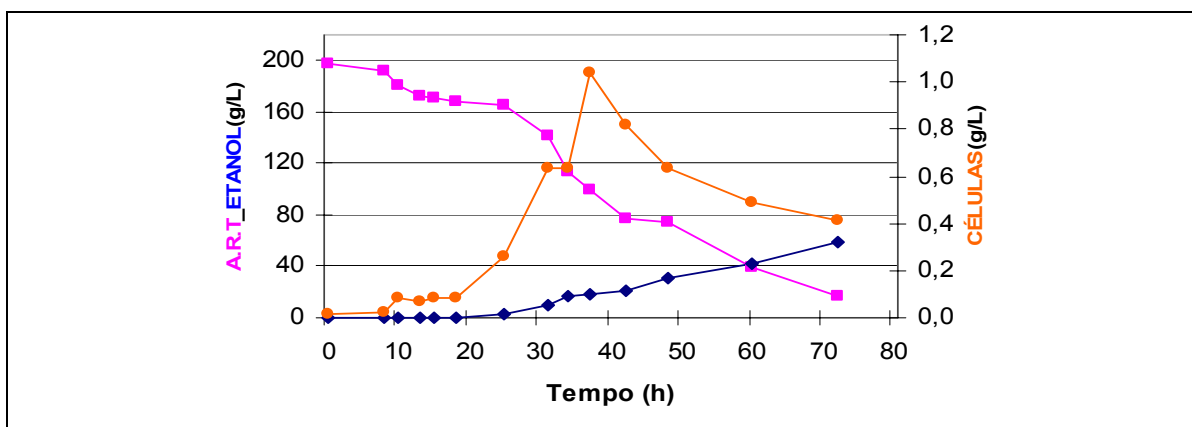


Figura 4.9 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 9 (T=30°C e pH=3,3, sem casca e com levedura selvagem)

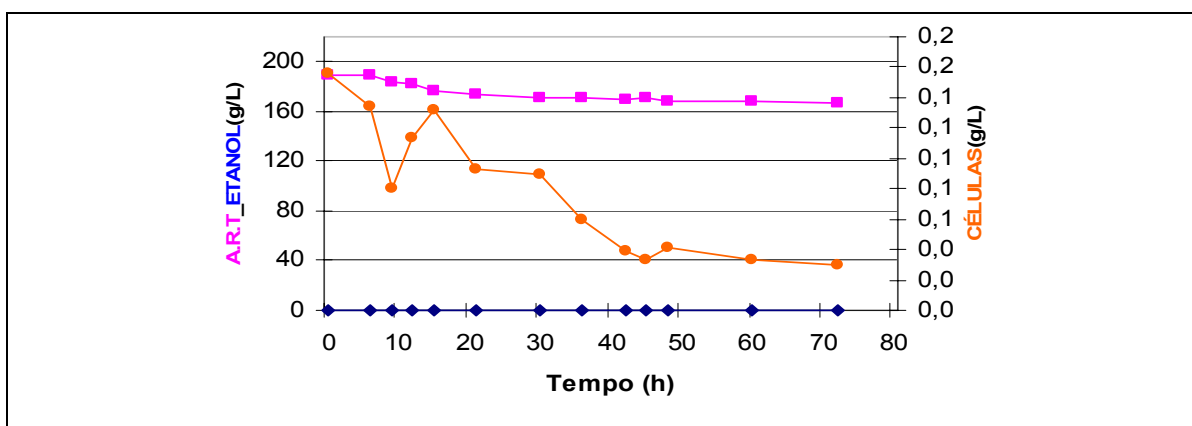


Figura 4.10 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 10 (T=24°C e pH=2,8, sem casca e com levedura selvagem)

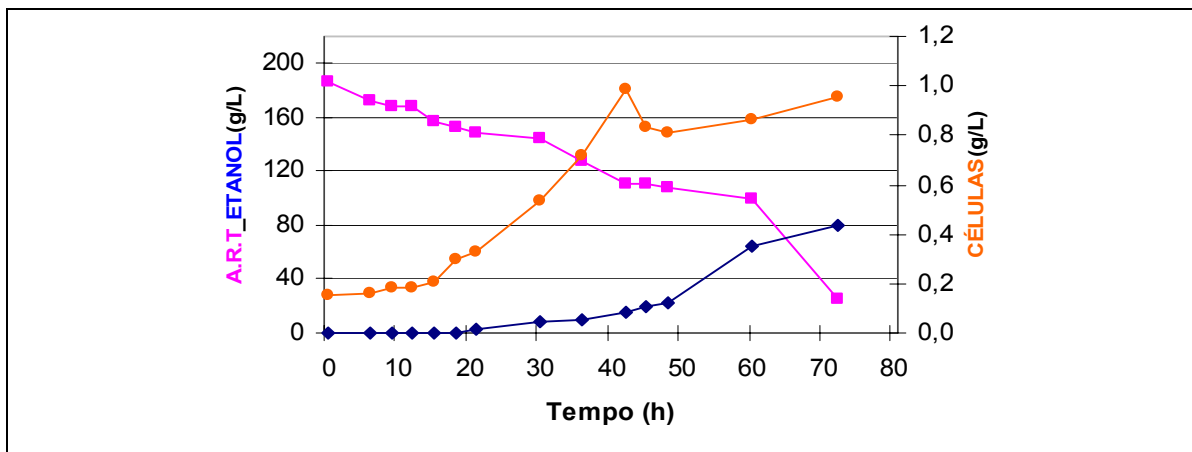


Figura 4.11 – Variação na concentração de etanol (♦), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 11 ($T=18^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, sem casca e com levedura selvagem)

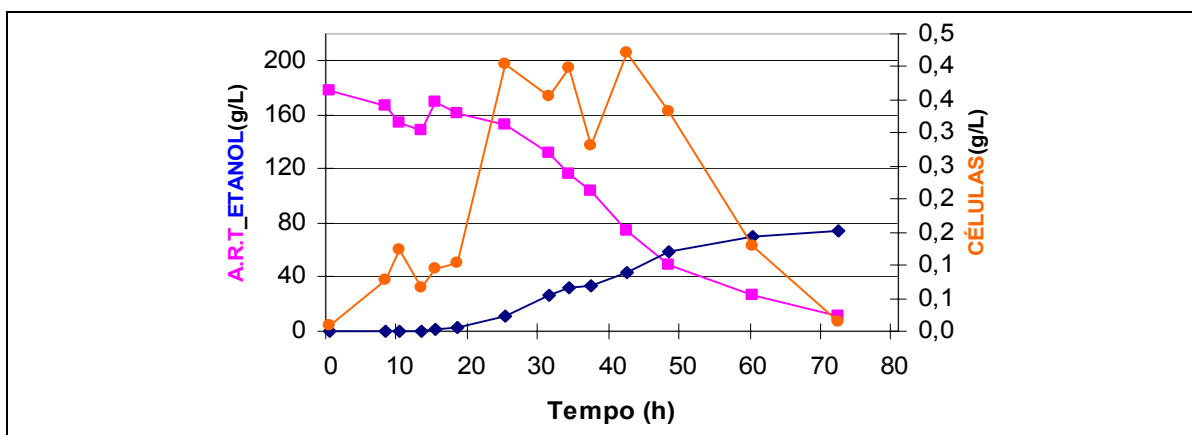


Figura 4.12 – Variação na concentração de etanol (♦), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 12 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,0$, com casca e com levedura selvagem)

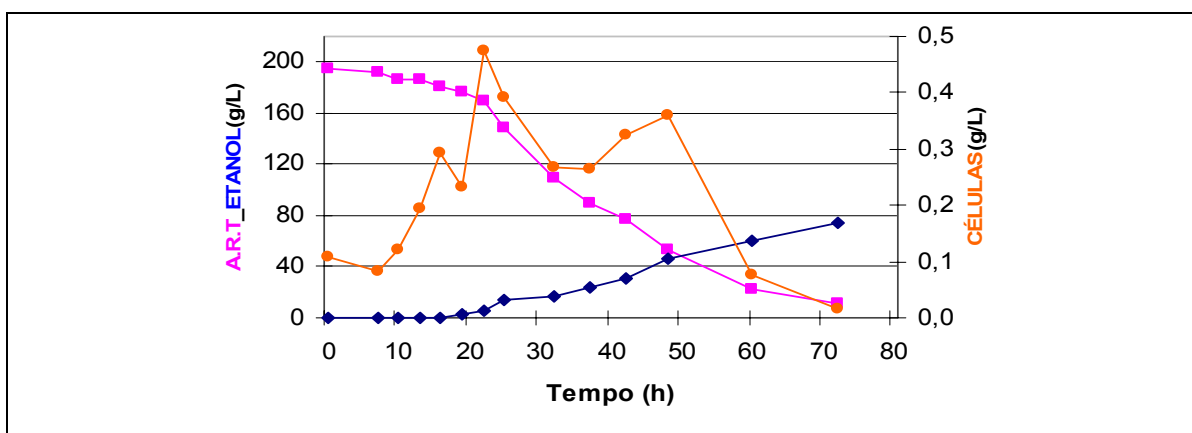


Figura 4.13 – Variação na concentração de etanol (♦), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 13 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, com casca e com levedura selvagem)

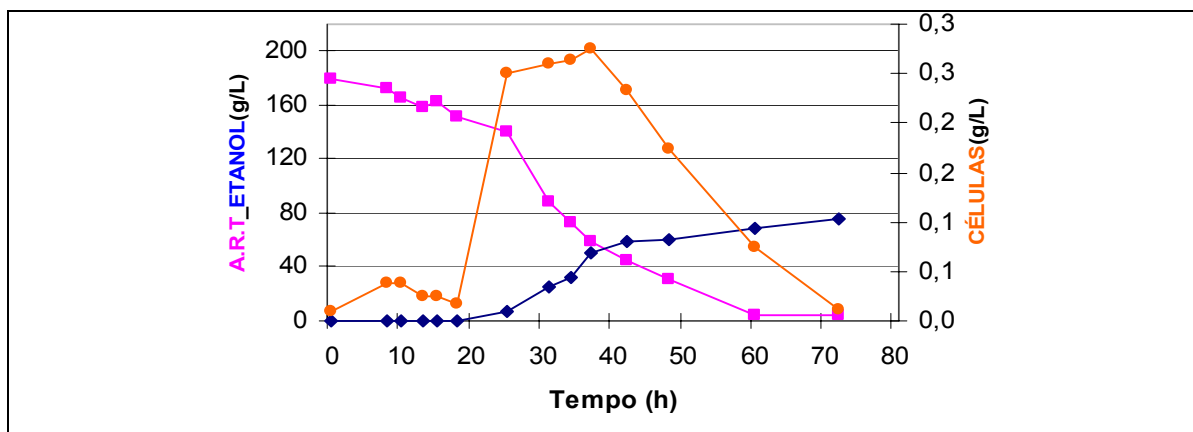


Figura 4.14 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 14(T=28°C e pH=3,0, com casca e com levedura selvagem)

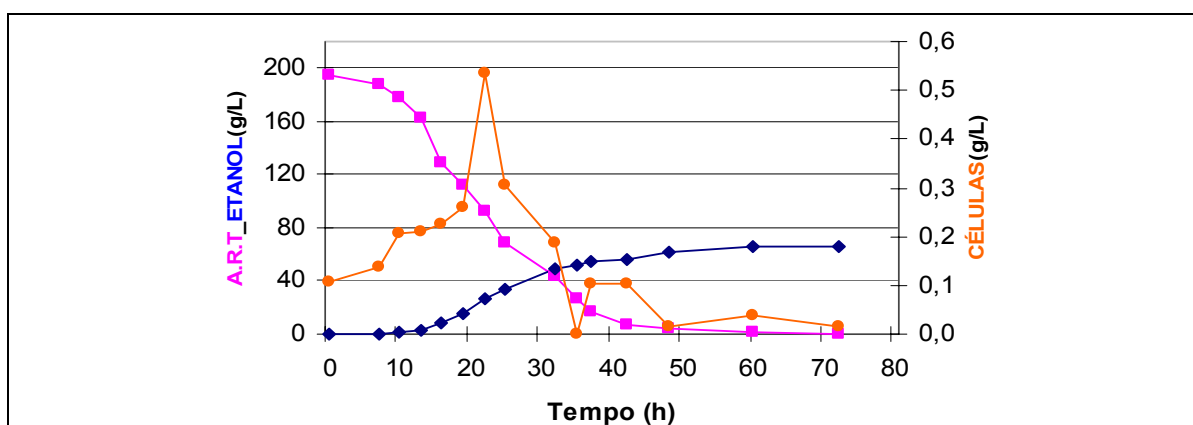


Figura 4.15 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 15(T=28°C e pH=3,6, com casca e com levedura selvagem)

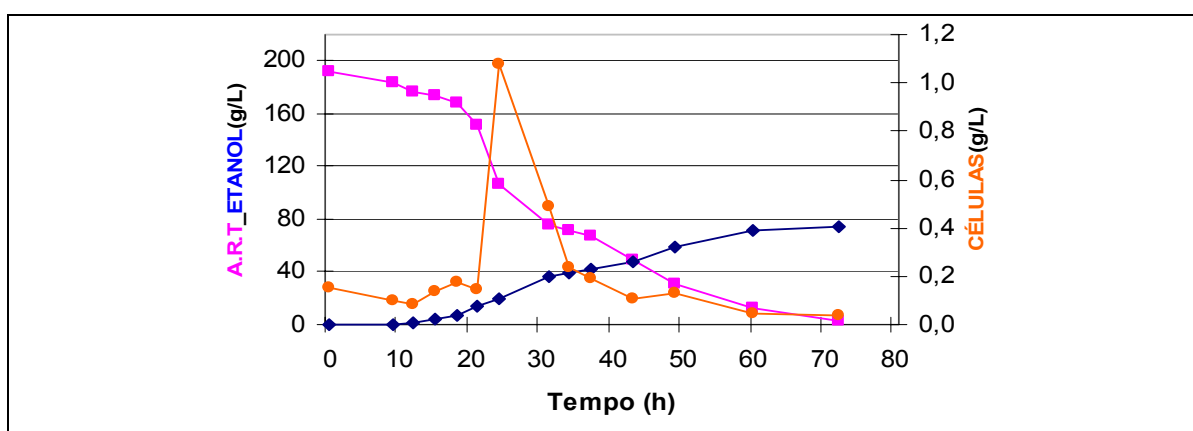


Figura 4.16 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 16(T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)

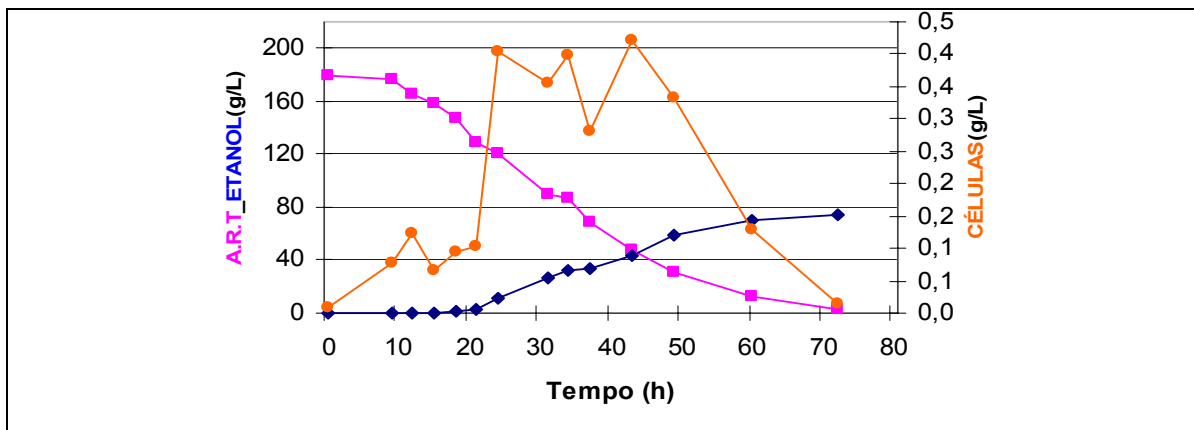


Figura 4.17 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 17(T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)

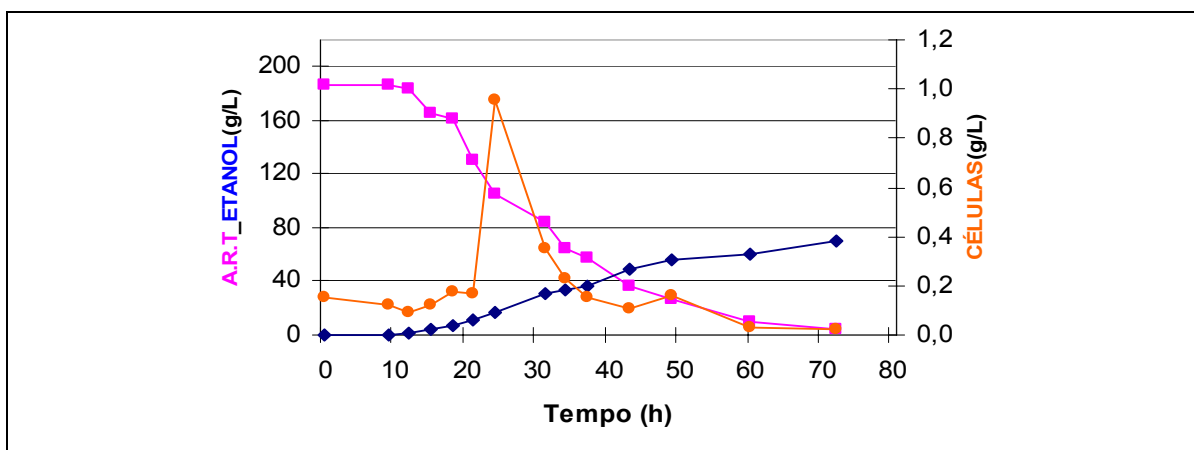


Figura 4.18 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 18(T=24°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)

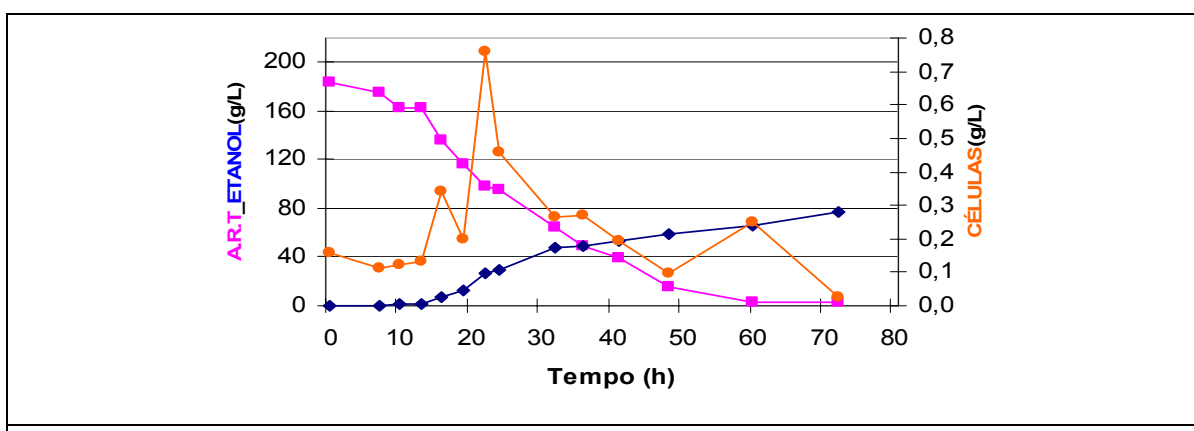


Figura 4.19 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 19(T=24°C e pH=3,8, com casca e com levedura selvagem)

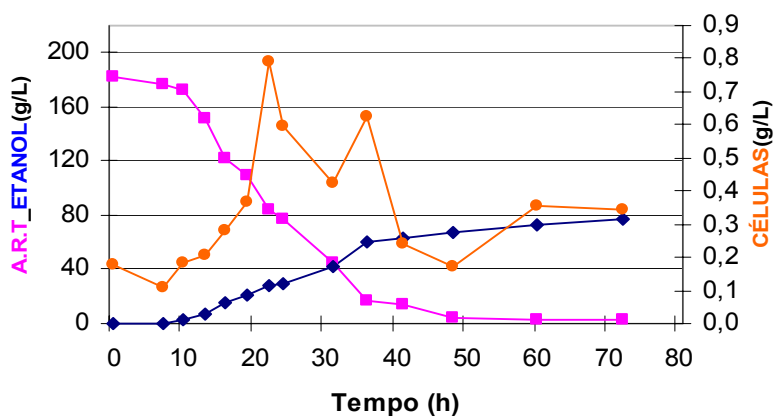


Figura 4.20 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 20 (T=30°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)

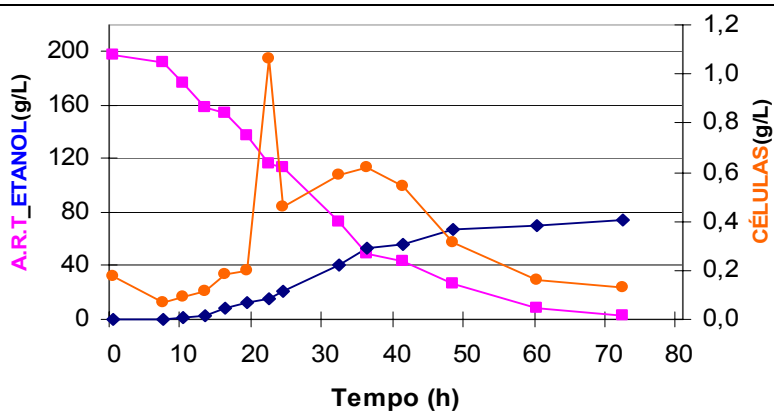


Figura 4.21 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 21 (T=24°C e pH=2,8, com casca e com levedura selvagem)

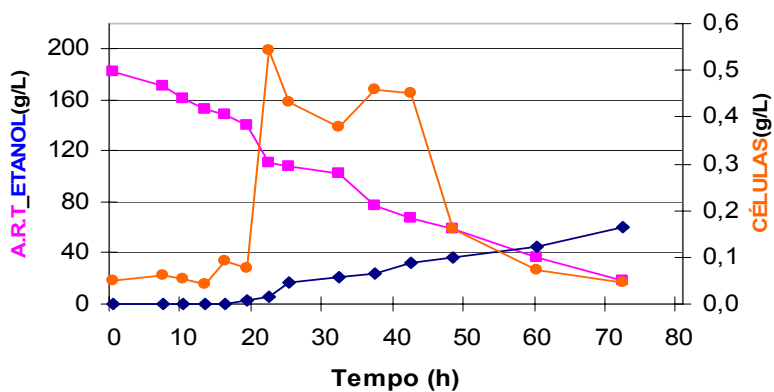


Figura 4.22 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●) e A.R.T. (■) durante o experimento 22 (T=18°C e pH=3,3, com casca e com levedura selvagem)

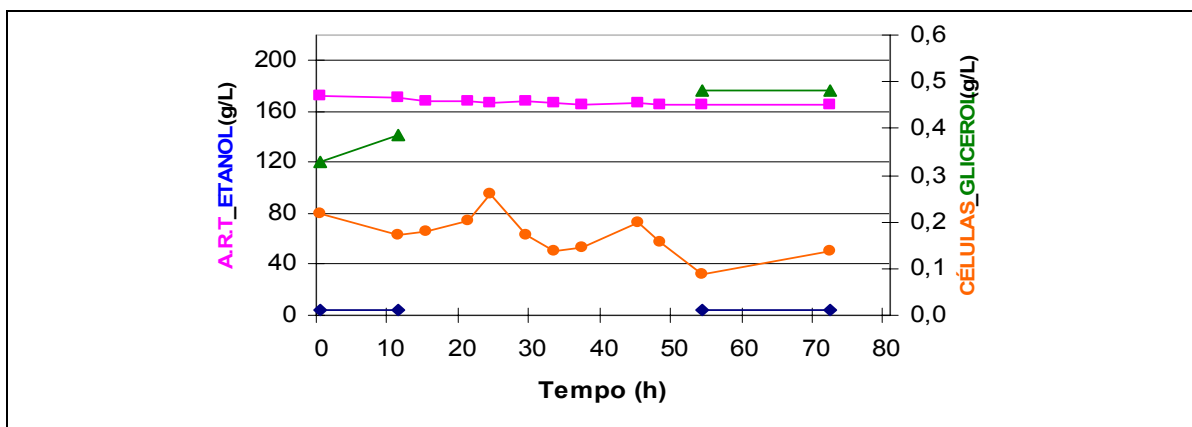


Figura 4.23 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 23 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,0$, sem casca e com levedura selecionada)

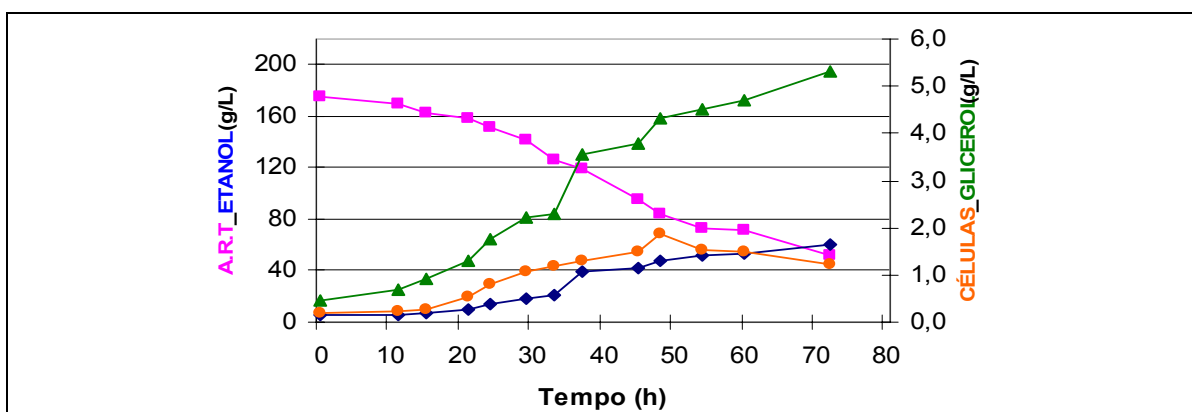


Figura 4.24 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 24 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, sem casca e com levedura selecionada)

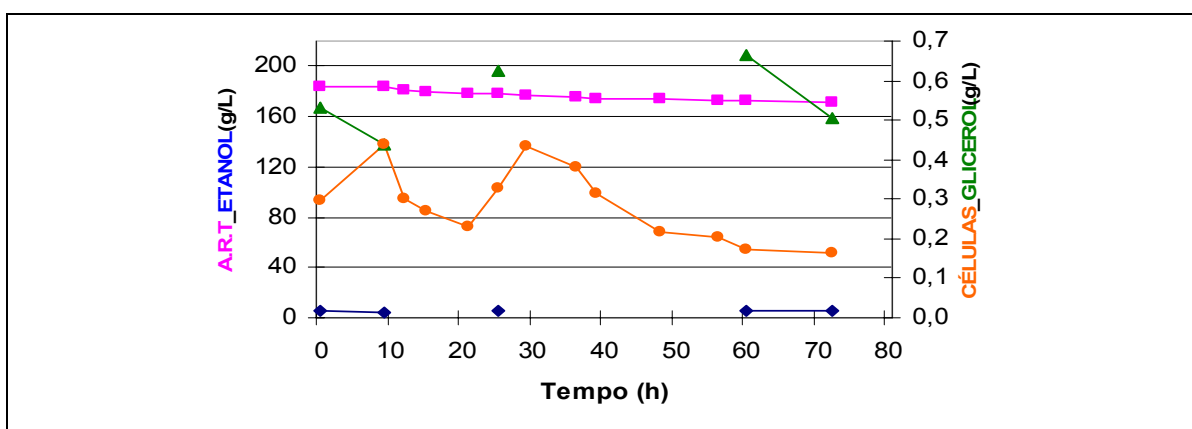


Figura 4.25 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 25 ($T=28^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,0$, sem casca e com levedura selecionada)

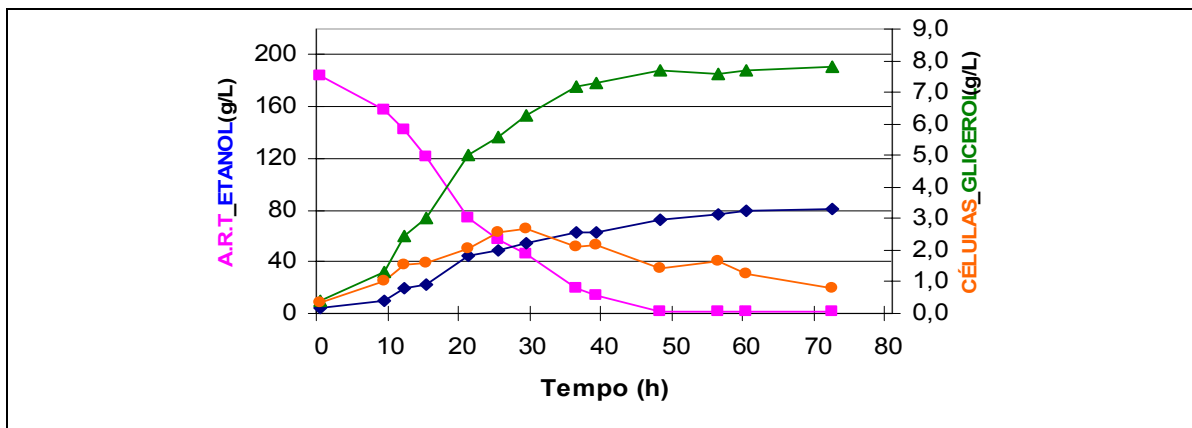


Figura 4.26 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 26 ($T=28^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, sem casca e com levedura selecionada)

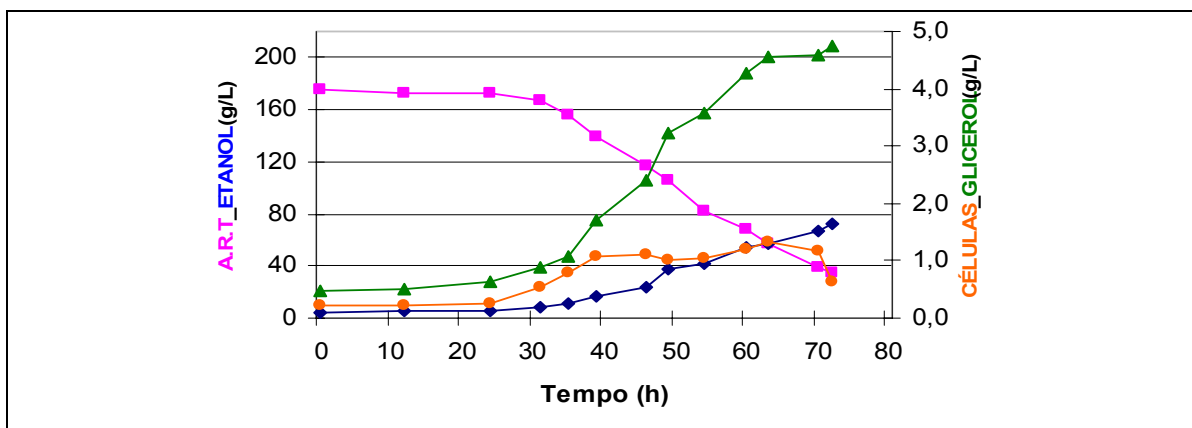


Figura 4.27 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 27 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, sem casca e com levedura selecionada)

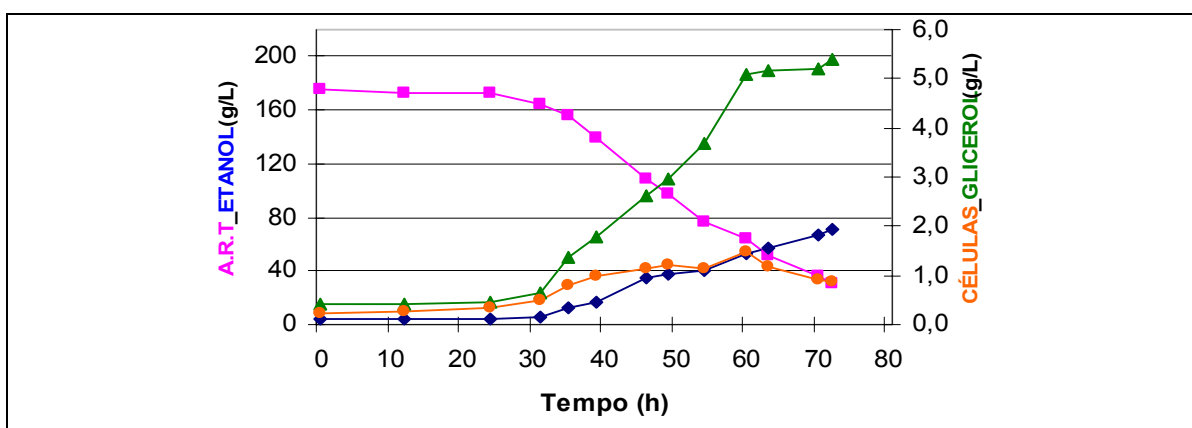


Figura 4.28 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 28 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, sem casca e com levedura selecionada)

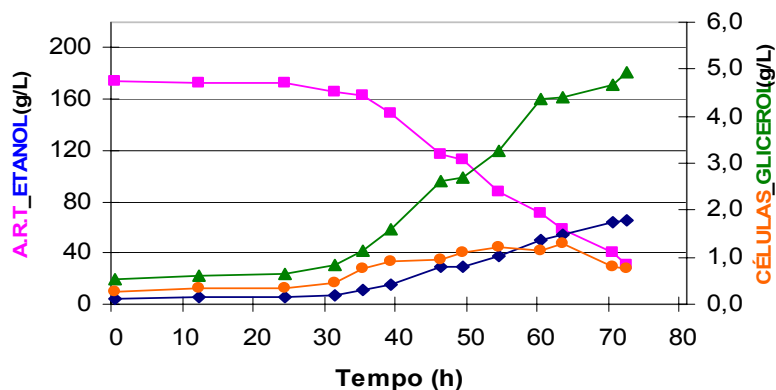


Figura 4.29 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 29 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, sem casca e com levedura selecionada)

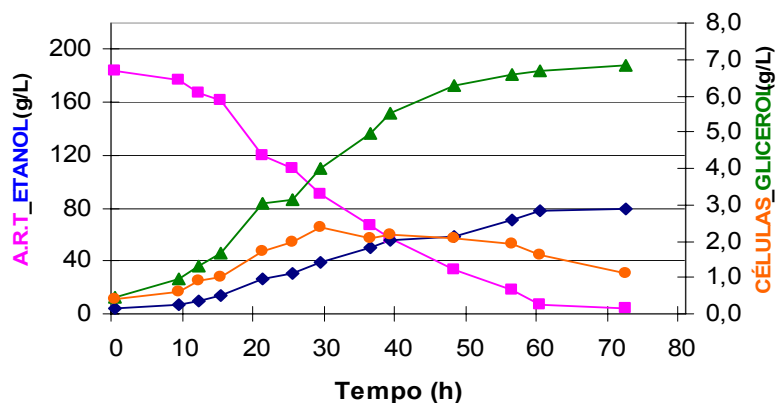


Figura 4.30 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 30 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,8$, sem casca e com levedura selecionada)

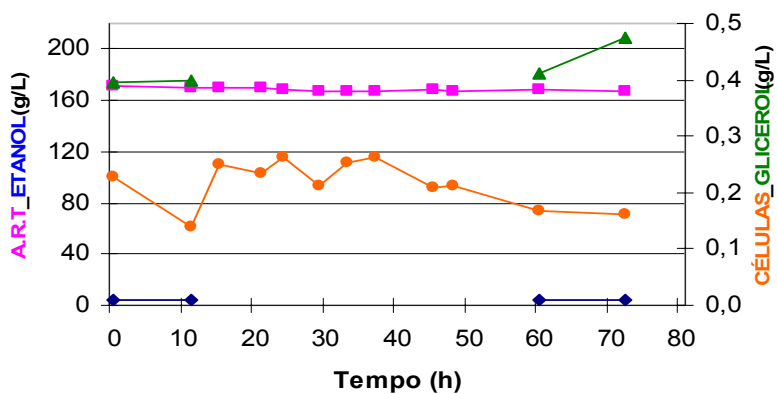


Figura 4.31 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 31 ($T=30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, sem casca e com levedura selecionada)

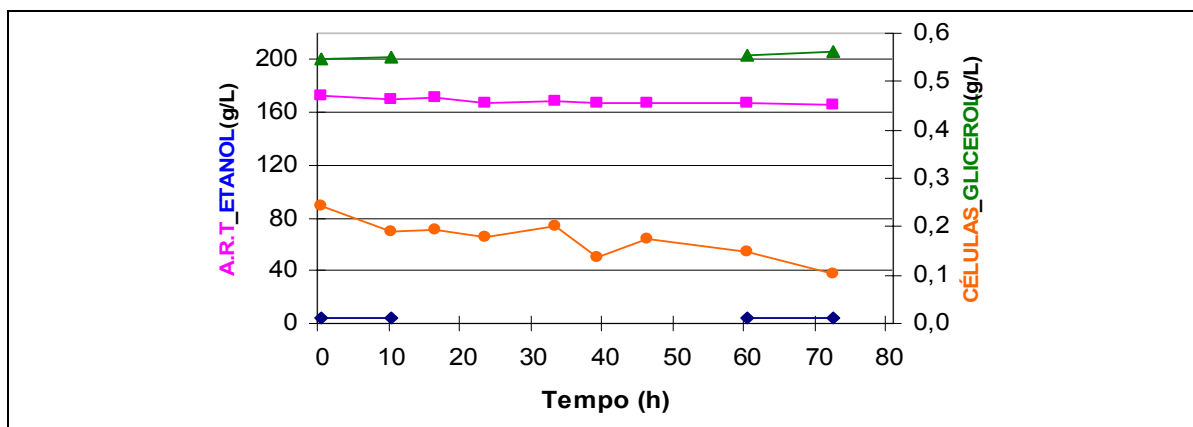


Figura 4.32 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 32 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=2,8$, sem casca e com levedura selecionada)

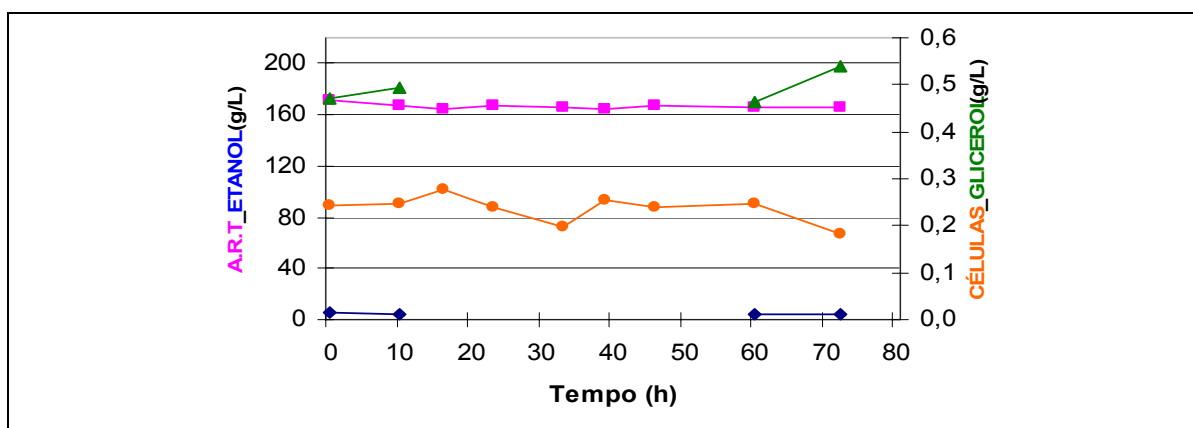


Figura 4.33 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 33 ($T=18^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, sem casca e com levedura selecionada)

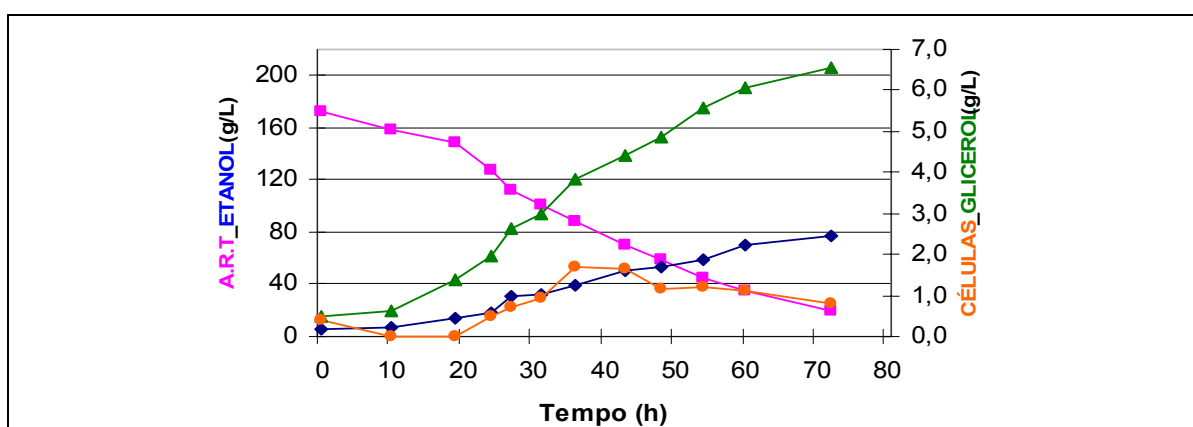


Figura 4.34 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 34 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,0$, com casca e com levedura selecionada)

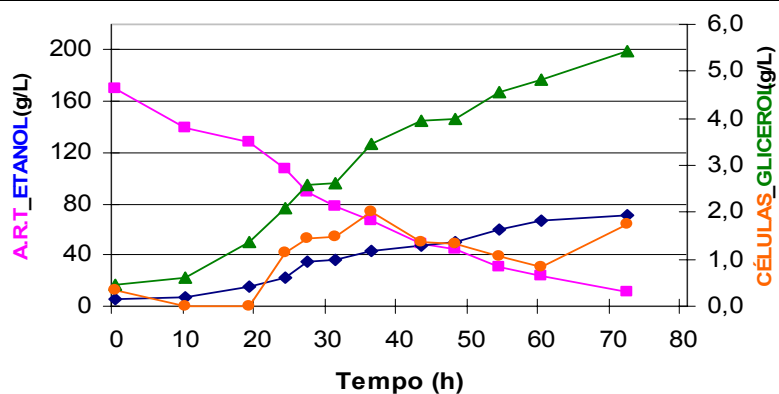


Figura 4.35 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 35 ($T=20^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, com casca e com levedura selecionada)

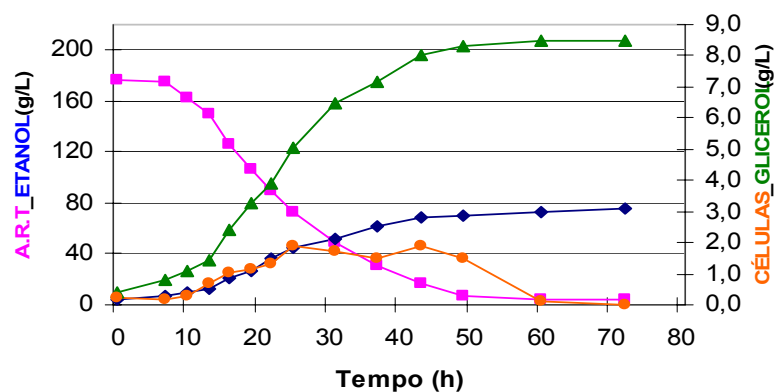


Figura 4.36 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 36 ($T=28^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,0$, com casca e com levedura selecionada)

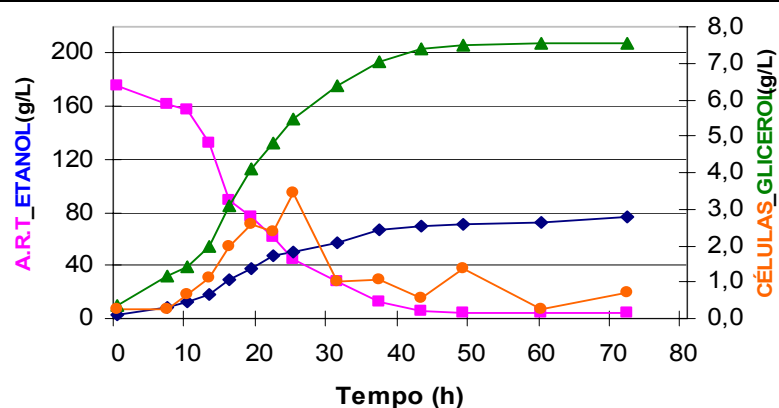


Figura 4.37 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 37 ($T=28^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,6$, com casca e com levedura selecionada)

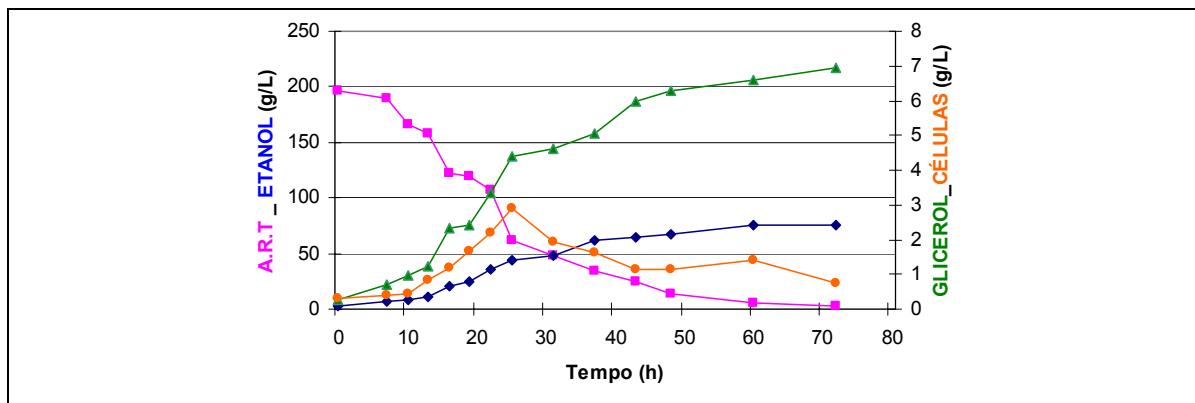


Figura 4.38 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 38 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, com casca e com levedura selecionada)

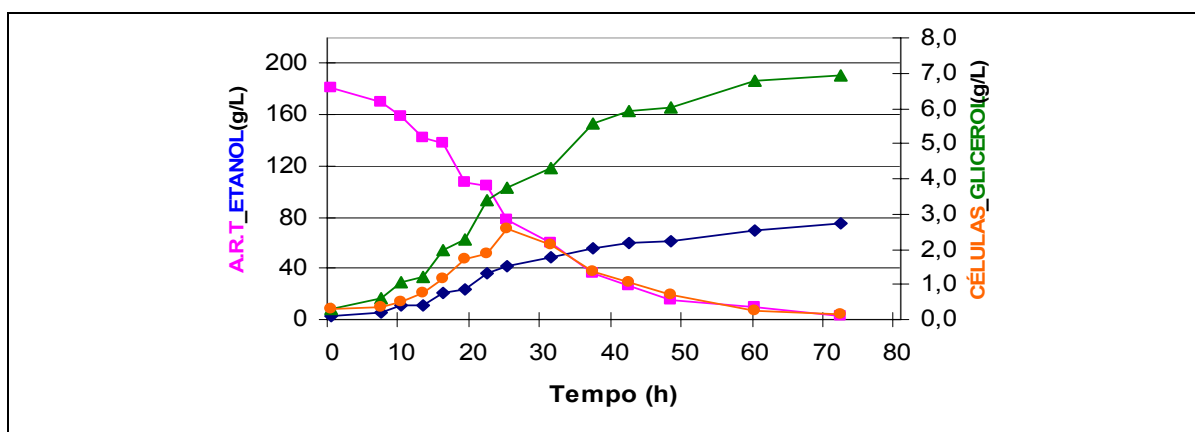


Figura 4.39 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 39 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$ com casca e com levedura selecionada)

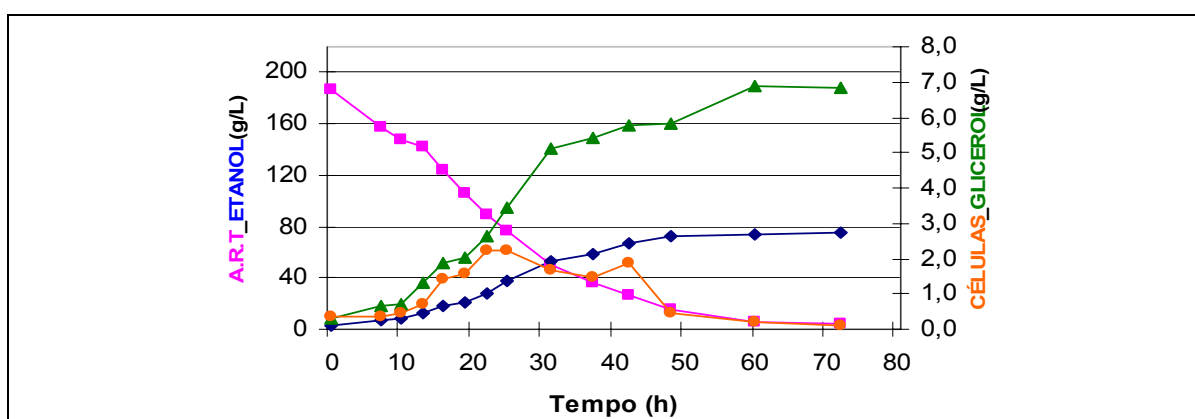


Figura 4.40 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 40 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, com casca e com levedura selecionada)

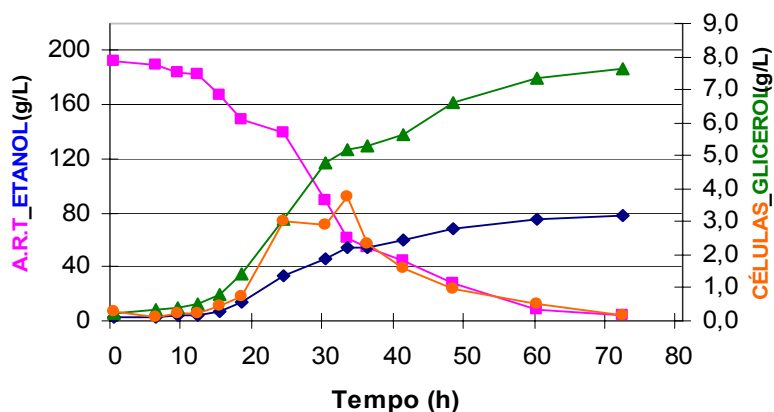


Figura 4.41 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 41 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,8$, com casca e com levedura selecionada)

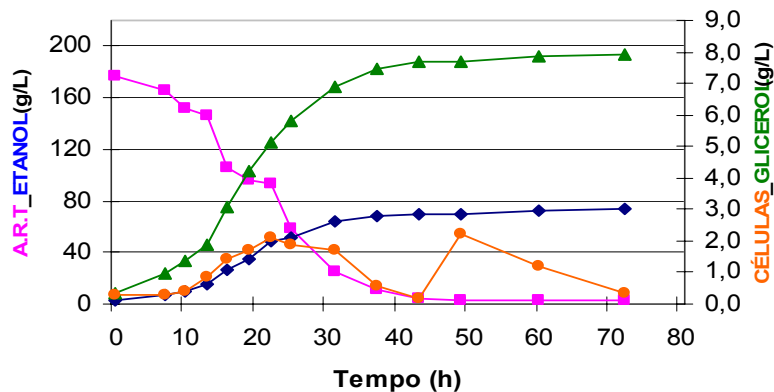


Figura 4.42 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 42 ($T=30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=3,3$, com casca e com levedura selecionada)

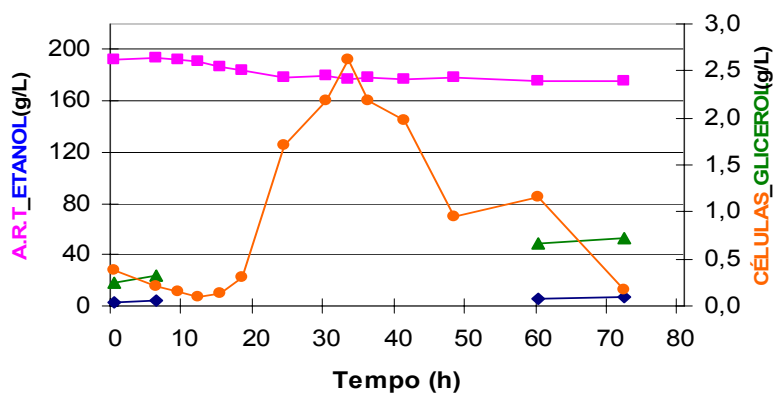
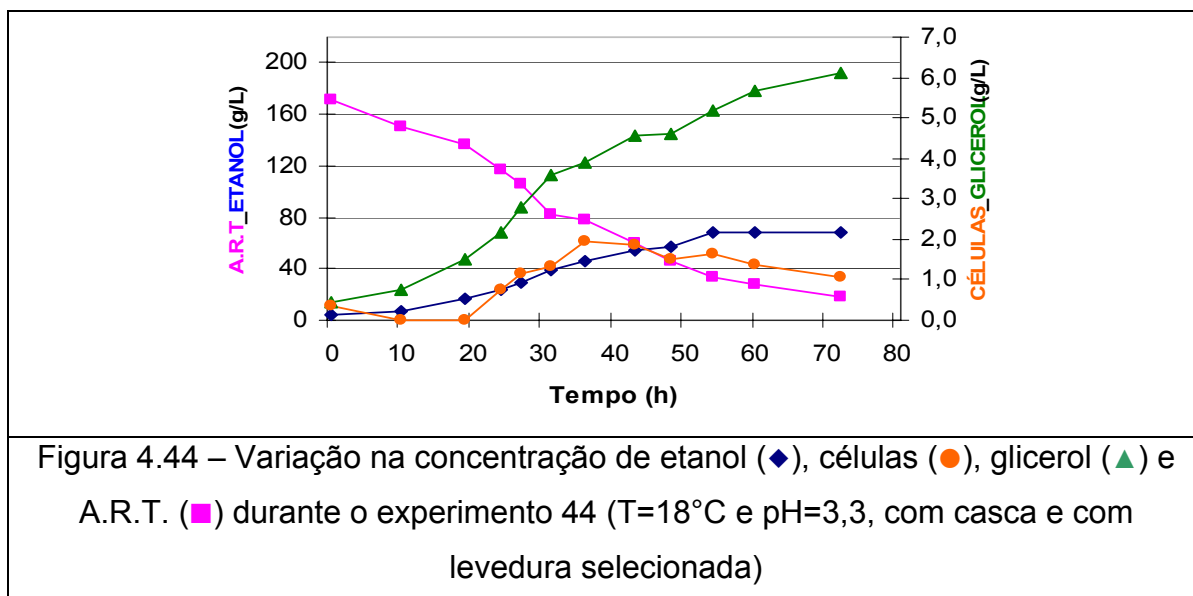


Figura 4.43 – Variação na concentração de etanol (◆), células (●), glicerol (▲) e A.R.T. (■) durante o experimento 43 ($T=24^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=2,8$, com casca e com levedura selecionada)



4.2 PRODUÇÃO DE ETANOL, GLICEROL, CÉLULAS E CONSUMO DE A.R.T. AO FINAL DA FERMENTAÇÃO TURBULENTA E NOS VINHOS FINAIS

Os valores codificados das condições de pH inicial e temperatura assim como os principais resultados obtidos nos 22 ensaios realizados com mosto da uva Itália, conduzidos com levedura selvagem para fermentações realizadas na ausência e na presença da casca, em termos de máxima concentração de etanol atingida (Et_M) e o tempo de fermentação correspondente (t_M) assim como a concentração de açúcares redutores totais (ART_M) no tempo t_M , conforme definidos no item 3.6 de Materiais e Métodos, estão resumidos na Tabela 4.1. A mesma tabela apresenta também dados importantes sobre as características dos vinhos finais, ou seja, coletados após 50 dias do término da fermentação turbulenta, em termos da concentração de etanol (Et_f), glicerol ($Glic_f$), acidez volátil (Ac. Vol), açúcares redutores totais ($A.R.T._f$) e pH final. Já os valores correspondentes para os vinhos obtidos no término da fermentação turbulenta assim como os vinhos finais obtidos nos outros 22 experimentos realizados com levedura selecionada estão apresentados na Tabela 4.2, a qual ainda inclui a concentração de glicerol ($Glic_M$) no tempo t_M .

Deve-se salientar que nas Tabelas 4.1 e 4.2 estão relacionadas também as concentrações iniciais de etanol (Et_i), glicerol ($Glic_i$) e A.R.T ($A.R.T._i$). Além dos valores das variáveis medidas durante o experimento, as Tabelas 4.1 e 4.2 também

apresentam os valores da produtividade em etanol ($PROD_{Et}$) e do rendimento global (η_{ET}). O primeiro foi calculado através da Equação 3.4, utilizando os valores iniciais e “máximos” das concentrações de etanol juntamente com o respectivo tempo (t_M). Já o último foi determinado pela Equação 3.5, utilizando os valores iniciais da concentração de A.R.T e etanol das amostras, juntamente com os valores “máximos” das referidas variáveis.

Um importante fato observado nos dados apresentados tanto na Tabela 4.1 quanto na Tabela 4.2 é que em todos os ensaios realizados foi obtida uma graduação alcoólica superior à mínima exigida pela legislação brasileira (BRASIL, 2004), para que o fermentado de uva seja classificado como vinho de mesa ($8,6^\circ GL$ ou aproximadamente $69g/L$). Entretanto, $10,5^\circ GL$ (aproximadamente $84g/L$) é o menor grau alcoólico recomendado para garantir uma boa conservação do vinho (RIZZON *et al.*, 1996), valor somente alcançado nos ensaios (1, 2, 5, 8, 9, 10, 11 e 24) realizados sem casca. Já nos experimentos realizados na presença de casca apenas o ensaio 20 atingiu esse valor.

O teor de etanol relativamente baixo pode ser atribuído, no caso das fermentações realizadas com levedura selvagem, ao fato de que, na prática, são necessários de 17 a 21g de açúcar por litro de mosto para a obtenção de $1^\circ GL$ de álcool (PATO, 1998). Ou seja, para a produção de um vinho com graduação de $10^\circ GL$ é necessário que o mosto inicial tenha uma concentração entre $170g/L$ e $210g/L$. A maior concentração de açúcar não ocorreu em nenhum dos experimentos. Além disso, a baixa concentração de etanol no meio pode também estar relacionada a outros fatores, como a diferença no rendimento apresentado pelas leveduras e às perdas de etanol devido à evaporação.

Com relação às fermentações com leveduras selecionadas, uma possível explicação para o baixo teor de etanol é o fato de que provavelmente as condições em que ocorreram as fermentações não são as mais indicadas para essas leveduras. Essa observação é reforçada considerando que, como comentado anteriormente, as leveduras selecionadas apresentaram uma maior dificuldade para fermentar em um meio onde havia sido adicionada grande quantidade de $K_2S_2O_5$ juntamente com baixo pH inicial. Além disso, a levedura selecionada empregada não atinge a produção $1^\circ GL$ a partir de 17g de açúcar, pois, segundo o fabricante, sua melhor levedura produz $1^\circ GL$ utilizando 18 a 19g de açúcar.

Deve-se salientar que a produção de vinhos deficitários em etanol é um fato comum no cotidiano das vinícolas brasileiras. Para solucionar esse problema os vinicultores dispõem de duas maneiras economicamente viáveis. A primeira é fazer uma mescla de vinhos com diferentes graduações para se obter a concentração de etanol necessária. A segunda é o acréscimo de etanol proveniente do açúcar de cana, tendo essa última solução a restrição de que 70% de todo etanol presente no vinho tem que ser originado do açúcar existente na própria uva. Além dessas duas soluções, o vinicultor ainda tem a possibilidade de acrescentar álcool vínico, mas essa solução é muito pouco viável economicamente.

Além da classificação com relação ao teor de álcool, o vinho também é classificado pela legislação brasileira com respeito à concentração de açúcares totais. Assim o vinho seco pode apresentar no máximo 4,0g/L de açúcar total (BRASIL, 2004). Nota-se pelos valores listados nas tabelas 4.1 e 4.2 que todos os vinhos provenientes dos 44 ensaios são classificados como vinho seco.

É interessante notar que os valores de A.R.T._f estão próximos de zero para a maioria dos ensaios, indicando total consumo do substrato, o que também contribui para uma boa sanidade do vinho (PATO, 1998). Essa observação não é válida apenas para o décimo ensaio, onde foram empregados pH inicial de 2,8 e alta concentração de SO₂, o que provavelmente provocou uma maior dificuldade para o desenvolvimento das leveduras e a transformação do açúcar em etanol e outros produtos. Embora a quantidade adicionada de SO₂ deva ser alterada de acordo com o pH do mosto (HASHIZUME, 2001), essas alterações não puderam ser incorporadas no preparo dos mostos para os ensaios, pois no tratamento dos mostos realizado na Vitivinícola Góes utilizou-se uma quantidade de metabissulfito de potássio um pouco superior à recomendada por HASHIZUME (2001) e RIZZON *et al.* (1996), por terem sido empregadas uvas de baixo custo com qualidade inferior. Nesse caso, utiliza-se uma sulfitação um pouco mais enérgica do que a normalmente empregada em fermentações que utilizam uvas em perfeito estado (PATO, 1998) para minimizar o risco de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Ainda analisando os dados de A.R.T. obtidos no vinho final, vale a pena comentar que aqueles ensaios que não ocorreram durante as 72 horas iniciais de fermentação (ensaios 10, 23, 25, 31, 32, 33 e 43) foram concluídos na fase de maturação, sem grandes alterações em termos de concentrações finais de glicerol,

etanol ou A.R.T., se comparados aos resultados obtidos nos outros ensaios. As exceções à afirmação acima se encontram nos valores um pouco mais altos para a concentração residual de açúcar redutor encontrados nos ensaios 10, 23, 31 e 32 assim como nos valores um pouco mais baixos para a concentração de etanol nos ensaios 31, 32 e 33.

Outro fator importante para a qualidade do vinho é o glicerol. A literatura recomenda que, em vinhos secos, a concentração de glicerol (Glic_f) esteja entre 4 e 10g/L (NIEUWOUDT, 2002). Analisando-se os valores apresentados na Tabela 4.1, nota-se que a produção de glicerol está dentro da faixa esperada. É interessante observar ainda que a fermentação promovida na ausência de casca (maior teor de SO₂) apresentou menor concentração de glicerol do que o vinho proveniente da fermentação com casca. Esta constatação é oposta à relatada na literatura, que tem relacionado o aumento na concentração de glicerol à adição de altos teores de SO₂ (NIEUWOUDT, 2002).

A concentração de glicerol é afetada pela temperatura de fermentação e diminui com o abaixamento da mesma (BALLI, 2003). Este comportamento pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 4.1 e 4.2, aonde se verifica que a menor concentração de glicerol, tanto nas fermentações com casca quanto nas sem casca, ocorreu quando a temperatura de fermentação foi fixada em 18°C. Este comportamento não foi observado no experimento realizado com casca e levedura selecionada, entretanto o valor da concentração de glicerol a 18°C é um dos menores.

Além disso, o teor de glicerol nos vinhos depende de diversos fatores, entre os quais a concentração e tipo de substrato, assim como da variedade de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada (YALÇIN, 2004). A influência da variedade de levedura pode ser observada quando se comparam os valores da concentração de glicerol dos experimentos realizados com levedura selvagem com os da levedura selecionada, nas quais obteve-se maior concentração de glicerol.

Tabela 4.1. Valores codificados das variáveis independentes, valores das variáveis respostas e da concentração de açúcares redutores totais (A.R.T.) obtidos do vinho final com levedura selvagem.

Exp	X ₁	X ₂	t _M (h)	Et _i (g.L ⁻¹)	Et _M (g.L ⁻¹)	Et _f (g.L ⁻¹)	PROD _{Et} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Glic _i (g.L ⁻¹)	Glic _M (g.L ⁻¹)	Glic _f (g.L ⁻¹)	Ac. Vol. (g.L ⁻¹)	A.R.T. _i (g.L ⁻¹)	A.R.T. _M (g.L ⁻¹)	A.R.T. _f (g.L ⁻¹)	η _{Et}	pH final
Fermentação Sem Casca	1	-1	-1	108	0	58,29	85,91	0,54		4,22	0,66	194,50	65,52	1,30	0,45	3,04
	2	1	-1	72	0	62,88	84,33	0,87		4,18	0,60	198,22	39,09	1,04	0,40	3,38
	3	-1	1	108	0	75,25	73,33	0,70		4,23	0,54	195,43	3,72	1,01	0,39	3,03
	4	1	1	60	0	82,27	82,05	1,37		4,92	0,48	195,43	10,05	1,27	0,44	3,47
	5	0	0	72	0	56,85	84,50	0,79		3,95	0,54	195,43	40,58	1,41	0,37	3,38
	6	0	0	72	0	59,60	83,51	0,83		4,14	0,48	196,36	59,60	1,30	0,44	3,37
	7	0	0	72	0	56,70	79,17	0,79		3,99	0,48	196,36	37,23	1,41	0,36	3,36
	8	1,42	0	72	0	73,50	84,22	1,02		4,42	0,48	196,36	17,12	1,27	0,41	3,54
	9	0	1,42	72	0	58,60	86,97	0,81		3,98	0,48	197,29	16,38	1,27	0,32	3,32
	10	-1,42	0	72	0	0,00	87,92	0,00		5,63	0,66	188,92	166,77	3,64	0,00	2,99
	11	0	-1,42	72	0	79,80	84,56	1,11		3,72	0,54	187,06	25,55	1,23	0,49	3,37
Fermentação Com Casca	12	-1	-1	72	0	74,50	74,43	1,03		4,36	0,36	177,75	11,17	2,16	0,45	3,07
	13	1	-1	72	0	74,60	82,93	1,04		4,58	0,42	195,47	11,35	1,49	0,41	3,42
	14	-1	1	60	0	69,05	70,37	1,15		4,25	0,42	179,61	4,47	1,90	0,39	3,10
	15	1	1	48	0	61,20	79,63	1,28		4,73	0,60	195,43	3,72	1,01	0,32	3,55
	16	0	0	60	0	70,95	78,64	1,18		5,3	0,42	191,71	11,91	1,53	0,39	3,16
	17	0	0	60	0	66,80	79,48	1,11		5,64	0,48	179,61	11,91	2,38	0,40	3,11
	18	0	0	60	0	60,80	80,09	1,01		5,07	0,42	187,06	9,68	2,42	0,34	3,23
	19	1,42	0	60	0	66,10	76,76	1,10		5,53	0,30	184,26	2,98	1,41	0,36	3,66
	20	0	1,42	48	0	67,05	86,75	1,40		5,43	0,48	182,40	4,47	1,68	0,38	3,37
	21	-1,42	0	60	0	70,43	78,78	1,17		5,06	0,42	197,29	8,19	1,97	0,37	2,94
	22	0	-1,42	72	0	60,00	72,45	0,83		4,11	0,30	181,47	17,68	1,41	0,37	3,29

Tabela 4.2. Valores codificados das variáveis independentes, valores das variáveis respostas e da concentração de açúcares redutores totais (A.R.T.) obtidos do vinho final com levedura selecionada.

Exp	X ₁	X ₂	t _m (h)	Et _i (g.L ⁻¹)	Et _M (g.L ⁻¹)	Et _f (g.L ⁻¹)	PROD _{Et} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Glic _i (g.L ⁻¹)	Glic _M (g.L ⁻¹)	Glic _f (g.L ⁻¹)	Ac. Vol. (g.L ⁻¹)	A.R.T. _i (g.L ⁻¹)	A.R.T. _M (g.L ⁻¹)	A.R.T. _f (g.L ⁻¹)	η _{Et}	pH final	
Fermentação Sem Casca	23	-1	-1	72	3,99	4,52	78,90	0,01	0,33	0,48	4,82	0,84	172,17	165,65	2,35	0,08	3,09
	24	1	-1	72	4,96	60,26	86,90	0,77	0,45	5,33	7,17	0,54	174,96	51,37	0,71	0,45	3,57
	25	-1	1	72	4,94	5,09	78,50	0,00	0,53	0,61	5,78	0,96	184,26	171,24	1,15	0,01	3,18
	26	1	1	48	4,35	72,10	78,80	1,41	0,42	7,67	7,94	0,66	183,33	2,05	1,04	0,37	3,53
	27	0	0	72	4,67	72,38	79,70	0,94	0,48	4,74	5,55	0,54	174,96	34,25	1,15	0,48	3,36
	28	0	0	72	4,05	70,51	82,40	0,92	0,41	5,39	5,62	0,66	174,96	31,27	1,08	0,46	3,39
	29	0	0	72	4,74	65,93	83,30	0,85	0,53	4,94	5,62	0,60	174,03	31,27	0,89	0,43	3,40
	30	1,42	0	60,5	4,31	77,78	74,80	1,21	0,46	6,69	7,21	0,48	183,33	6,70	0,82	0,42	3,58
	31	0	1,42	72	4,20	4,53	75,20	0,00	0,40	0,48	5,54	1,02	171,24	166,58	1,86	0,07	3,38
	32	-1,42	0	72	4,35	4,70	77,80	0,00	0,55	0,55	6,09	0,96	172,17	166,58	2,31	0,06	2,88
Fermentação Com Casca	33	0	-1,42	72	4,16	4,81	76,80	0,01	0,47	0,54	5,87	0,66	171,24	165,65	0,78	0,12	3,42
	34	-1	-1	72	5,18	77,52	76,10	1,00	0,48	6,57	7,25	0,48	172,17	20,29	1,41	0,48	2,99
	35	1	-1	72	5,04	71,16	74,10	0,92	0,45	5,42	7,19	0,24	170,30	11,54	1,71	0,42	3,57
	36	-1	1	49	3,79	70,41	77,60	1,36	0,42	8,33	8,51	0,66	176,82	6,51	1,60	0,39	2,95
	37	1	1	43	3,32	69,10	78,60	1,53	0,37	7,39	8,02	0,36	175,89	5,21	1,41	0,39	3,45
	38	0	0	60	2,56	74,90	74,40	1,21	0,27	6,59	7,42	0,34	196,36	5,88	1,08	0,38	3,31
	39	0	0	60	3,03	68,98	73,60	1,10	0,30	6,78	7,97	0,24	180,54	9,80	1,30	0,39	3,27
	40	0	0	60	2,92	73,44	77,70	1,18	0,32	6,86	7,43	0,30	186,58	5,62	1,56	0,39	3,33
	41	1,42	0	60	2,41	75,72	75,90	1,22	0,22	7,34	7,73	0,36	191,71	7,82	1,45	0,40	3,60
	42	0	1,42	43	2,72	70,20	72,10	1,57	0,32	7,68	8,15	0,60	177,51	3,54	1,23	0,39	3,23
	43	-1,42	0	72	3,05	6,37	74,00	0,05	0,24	0,73	7,61	0,54	191,71	175,89	1,49	0,21	2,93
	44	0	-1,42	72	4,22	68,84	75,20	0,90	0,72	6,09	6,98	0,30	171,24	18,61	1,30	0,42	3,18

O teor de acidez volátil, o qual mede o grau de avinagramento do vinho, deve ser o mais baixo possível, porém é normal que todo vinho apresente acidez volátil, porque o ácido acético é um produto secundário normal da fermentação alcoólica (HASHIZUME, 2001). O limite máximo fixado para um vinho de mesa é de 1,2g/L de acidez volátil expressa em ácido acético (BRASIL, 2004). Teores elevados de acidez volátil são indicativos de alterações microbiológicas, causadas pela má sanidade da uva, pela falta de limpeza e higiene dos recipientes e por outros procedimentos inadequados na vinificação e conservação do vinho (RIZZON *et al.*, 1996). Com base nessas informações, nota-se pelos valores listados nas tabelas 4.1 e 4.2, que os vinhos experimentais produzidos apresentam uma excelente sanidade, exceção feita somente ao ensaio 31, o qual apresentou uma concentração de acidez volátil igual a 1,02g/L. Esses dados mostram que mesmo trabalhando com a uva "Itália" de baixa qualidade, foi possível produzir um vinho com um teor de acidez volátil abaixo dos limites tolerados. Por outro lado, as diferentes concentrações de acidez volátil podem estar relacionadas às condições que favoreceram o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido acético, predominantemente no início da fermentação, tais como: 1) ausência da camada de cascas localizada próxima à superfície, permitindo que o mosto ficasse diretamente exposto ao ar, 2) adição de maior quantidade de $K_2S_2O_5$ ao mosto fermentado sem casca, retardando o início da fermentação e da formação da camada de CO_2 no topo do biorreator.

As Tabelas 4.1 e 4.2 também apresentam os valores calculados para o rendimento em etanol (η_{Et}) nas diferentes condições experimentais investigadas. Para efeito comparativo, obteve-se na literatura (SHULER e KARGI, 1992) que o valor do fator de conversão máximo teórico para a fermentação alcoólica da glicose por *Saccharomyces cerevisiae*, é de 0,511 g de etanol/g glicose. Além disso, de acordo com PATO (1988), geralmente se obtém na prática um rendimento de etanol em relação ao substrato consumido próximo de 0,485. Observando os valores de $Y_{P/S}$ listados nas Tabelas 4.1 e 4.2, verifica-se que o rendimento em etanol foi geralmente menor do que o relatado na literatura. Porém, lembrando que as condições empregadas em todos os ensaios (uvas de baixa qualidade, adição de grande quantidade de sulfito) são bem diferentes das utilizadas na produção de vinhos finos, os valores de η_{Et} obtidos se tornam satisfatórios. De fato, dos 44 ensaios realizados, encontram-se 7 com valores para o rendimento em etanol acima

de 0,45, 13 com valores entre 0,4 e 0,45 e 24 com valores de η_{Et} abaixo de 0,4 g de etanol/g glicose. Entretanto, deve-se frisar que esses valores foram obtidos utilizando os dados obtidos no tempo t_M , caso fossem utilizados os valores referentes ao vinho final, apenas 6 ensaios apresentariam valores de η_{Et} abaixo de 0,4 g de etanol/g glicose.

Os experimentos 1, 11 e 12, realizados com levedura selvagem, atingiram um rendimento em etanol superior a 0,45. Nota-se que, com esse inóculo, a baixa temperatura favoreceu a concentração de etanol e assim gerou o aumento de η_{Et} , pois isso provavelmente dificultou que o etanol produzido fosse perdido por evaporação.

Já nos experimentos com leveduras selecionadas foram os ensaios 24, 28, 29 e 34 que alcançaram um η_{Et} superior a 0,45. Nota-se que todos os ensaios se concentraram nos valores de pH inicial superior a 3,3, ressalva feita ao ensaio 34, o qual foi realizado com um pH inicial de 3,0. Entretanto nesse ensaio como no 24 o fator que mais favoreceu o alto valor de η_{Et} foi provavelmente a baixa temperatura (20°C).

Da análise detalhada realizada anteriormente dos valores apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, vale ressaltar alguns aspectos. Enquanto a levedura selvagem apresentou valores de concentração de etanol melhores do que a levedura selecionada, a última apresentou o teor de glicerol maior. Além disso, nota-se forte influência da presença da casca, uma vez que os vinhos produzidos com casca apresentaram maior teor de glicerol e menor de etanol e acidez volátil. Outra constatação importante é que as fermentações sem casca apresentaram uma concentração de etanol maior do que os experimentos realizados com casca. Isso mostra a importância de se buscar alternativas no processo de produção para se melhorar uma determinada característica no vinho. Isso também vale para a concentração de glicerol, uma vez que os vinhos onde as fermentações ocorreram com as leveduras selecionadas apresentaram um teor mais elevado desse produto, do que os vinhos oriundos das fermentações com levedura selvagem.

Com a finalidade de verificar estatisticamente a validade das observações sobre a influência do tipo de levedura e da presença ou ausência de casca na concentração de etanol presente no vinho final, os valores de Et_f apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2 foram comparados por meio de testes F utilizando o programa

Excel (Tabela 4.3). Assim, pôde-se estimar qual a probabilidade dos resultados obtidos em dois experimentos não pertencerem a uma mesma população, ou seja, serem estatisticamente diferentes ou não.

Com base nos valores da Tabela 4.3, nota-se que estatisticamente existe diferença entre os experimentos realizados com a levedura selecionada (com casca e sem casca) e uma diferença bastante pronunciada entre os ensaios realizados com casca (levedura selvagem e levedura selecionada).

Além da comparação entre os resultados obtidos em ensaios com ou sem casca para cada levedura, a Tabela 4.3 confirma que a levedura selvagem produz mais etanol do que a selecionada. Para isso basta comparar os experimentos com cascas realizados pelas distintas leveduras, pois esses dois ensaios têm apenas 0,001% de chance de serem iguais.

Tabela 4.3 – Valores do teste F

EXPERIMENTOS COMPARADOS	PROBABILIDADE DE SEREM IGUAIS
Levedura selvagem, sem casca e com casca	0,31
Levedura selecionada, sem casca e com casca	0,08
Sem casca, com levedura selvagem e levedura selecionada	0,48
Com casca, com levedura selvagem e levedura selecionada	0,001

4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS

A partir dos valores apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2 e utilizando o software “Statistica 5.1” foram obtidas dez correlações empíricas por ajuste de polinômios de segunda ordem (Equação 4.3), que descrevem a variação da produtividade de etanol e da concentração de glicerol no tempo t_M e da acidez volátil do vinho final em função da temperatura e pH inicial para as fermentações realizadas na presença e ausência de casca com levedura selvagem e selecionada. Infelizmente devido à dificuldade de análise e também ao baixo volume de amostra nos experimentos realizados com levedura selvagem não se pode determinar com precisão a concentração de glicerol durante a fermentação turbulenta. Por isso, a correlação para essa variável resposta só foi apresentada para as fermentações com levedura selecionada.

A Equação (4.1) mostra a forma geral da correlação representando a variável resposta (y) estudada em função das variáveis independentes (em valores codificados), onde X_1 e X_2 são os valores codificados das variáveis pH inicial e a temperatura, respectivamente.

$$y = a + b.X_1 + c.X_1^2 + d.X_2 + e.X_2^2 + f.X_1.X_2 \quad (4.1)$$

Os valores dos coeficientes “a” a “f” estão resumidos nas tabelas 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente, para as respostas produtividade em etanol na fermentação turbulenta, produção de glicerol na fermentação turbulenta e concentração de acidez volátil no vinho final.

4.3.1 PRODUTIVIDADE EM ETANOL ($PROD_{Et}$)

Nas tabelas 4.4 e 4.5, referentes aos ensaios com levedura selvagem e selecionada respectivamente, estão representados os valores obtidos para os coeficientes da correlação que fornece uma estimativa da variável resposta $PROD_{Et}$ ao término da fermentação turbulenta tanto nos experimentos onde a fermentação ocorreu na ausência da casca quanto na presença da mesma. Além disso, essa tabela também fornece os valores do coeficiente de correlação (r) e do teste F.

Os gráficos das superfícies de resposta para a produtividade em etanol, correspondentes às correlações ajustadas aos dados experimentais, estão apresentados nas figuras 4.45 e 4.46.

Analisando a Tabela 4.4, nota-se que o efeito do pH é mais significativo do que o da temperatura na variável resposta $PROD_{Et}$, quando se fermentou sem casca. Entretanto, quando se fermentou com a casca da uva a temperatura apresentou um efeito mais significativo do que o pH. Provavelmente, a presença de casca pode ter minimizado a influência do pH, já que o suco próximo da casca, rico em cátions como potássio e sais, é liberado gradativamente durante a fermentação e pode contribuir para aumentar o pH (DARIAS-MARTIN *et al.*, 2003). Por isso, em consequência da pouca frequência de homogeneização do meio fermentativo, a região próxima ao chapéu pode ter se tornado mais propícia para a fermentação. Com relação à Tabela 4.5, nota-se que quando se fermentou com casca o efeito do pH é de mesma ordem de grandeza do efeito da temperatura, sendo observado que o efeito do pH é mais significativo na fermentação sem casca.

Tabela 4.4 - Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta $PROD_{Et}$ para as fermentações com levedura selvagem.

Casca	Coeficientes						r	F
	a	b	c	d	e	f		
Ausente	0,80	0,31	-0,11	0,03	0,11	0,09	0,911	0,794
Presente	1,10	0,00	0,02	0,14	0,01	0,03	0,890	0,664

Tabela 4.5 - Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta $PROD_{Et}$ para as fermentações com levedura selecionada.

Casca	Coeficientes						r	F
	a	b	c	d	e	f		
Ausente	0,91	0,49	-0,12	0,19	-0,29	0,16	0,991	0,881
Presente	1,18	0,22	-0,25	0,27	0,23	0,06	0,819	0,859

Outro fato observado nessas tabelas é o efeito positivo do aumento da temperatura na produtividade em etanol para todas as combinações, como pode ser visto nas figuras 4.45 e 4.46. Além disso, observa-se nessas tabelas 4.4 e 4.5 que os valores para o coeficiente de correlação (r) dos experimentos foram razoáveis, indicando que a correlação de segunda ordem representa satisfatoriamente os pontos experimentais, especialmente quando se fermenta sem casca.

Analisando as figuras 4.45 e 4.46 verifica-se que a forma das superfícies geradas apresenta considerável semelhança, tanto quando se comparam os experimentos realizados com mesmo inóculo como quando se comparam ensaios de diferentes inóculos, mas com mesmo modo de preparo do meio fermentativo (com casca ou sem casca). Além disso, nota-se que as superfícies de respostas representaram bem o aumento da produtividade em etanol nas condições de cultivo mais favoráveis para o desenvolvimento das leveduras, ou seja, em valores mais elevados de pH inicial e temperatura.

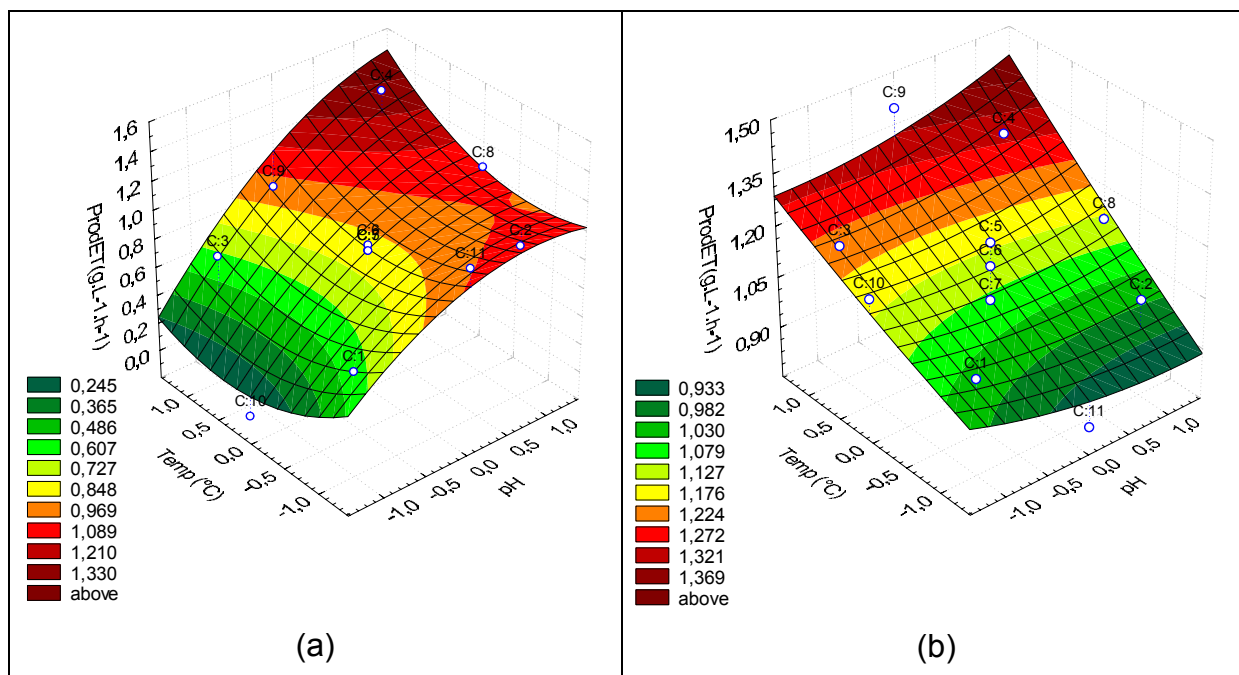


Figura 4.45 – Superfícies de resposta representando a variação da produtividade de etanol em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selvagem na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).

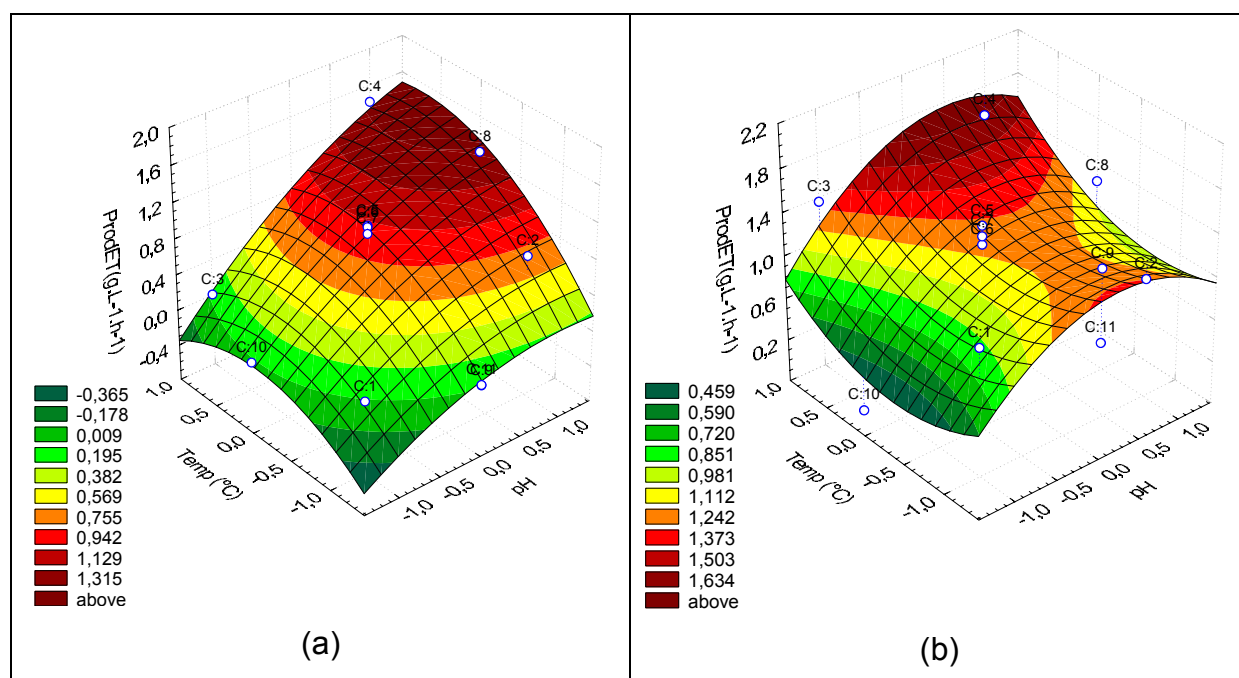


Figura 4.46 – Superfícies de resposta representando a variação da produtividade de etanol em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura selecionada na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).

4.3.2 CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL (C_{GLIC})

Como já visto anteriormente, o estudo sobre o teor de glicerol é importante porque ele contribui para o sabor do vinho, proporcionando ao mesmo certa maciez (HASHIZUME, 2001). Entretanto o glicerol não está envolvido em mudanças no aroma do vinho branco (LUBBERS *et al.*, 2001).

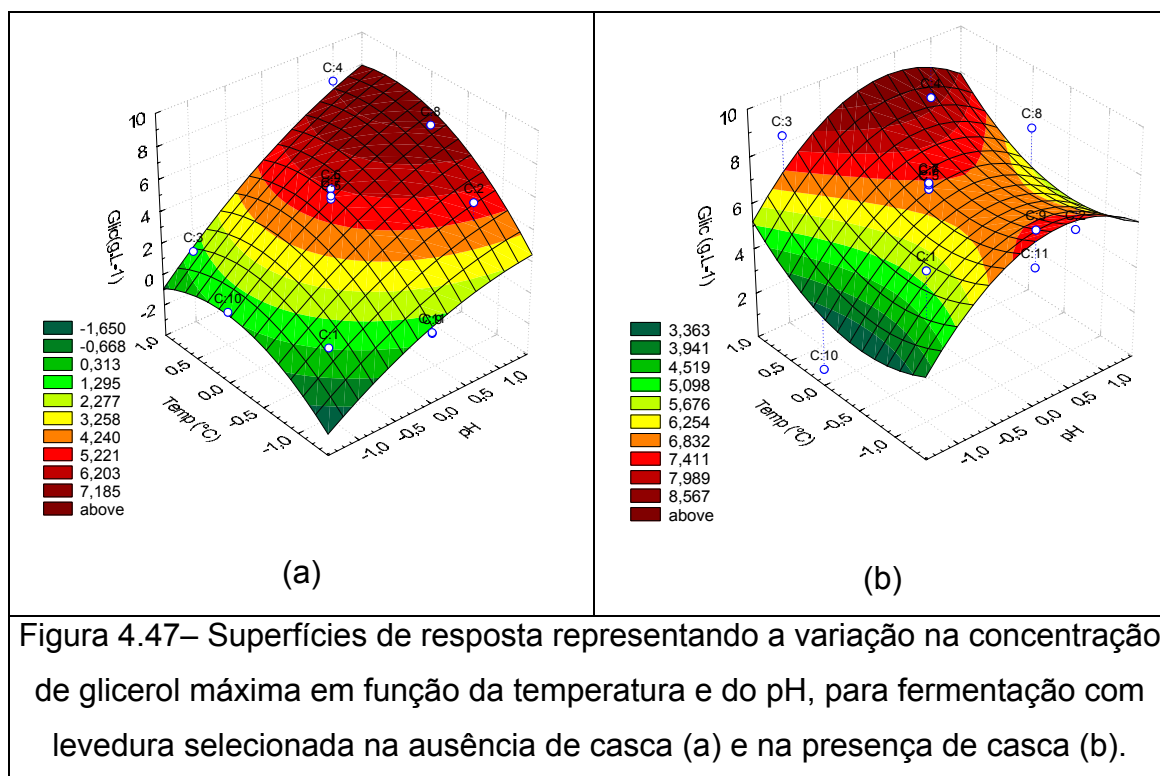
As correlações para a variável resposta C_{GLIC} ao término da fermentação turbulenta têm o mesmo formato da Equação (4.1), porém nesse caso a variável dependente y é a C_{GLIC} . Os coeficientes dessas correlações (fermentação sem casca e com casca) juntamente com os valores do coeficiente de correlação (r) e o teste F estão apresentados na Tabela 4.6. Já os gráficos de superfície de resposta estão apresentados na figura 4.47. Como já mencionado anteriormente, a correlação para essa variável resposta foi obtida apenas para as fermentações conduzidas com a levedura selecionada, sendo que os valores experimentais de $Glic_M$ são os listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.6 - Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta C_{GLIC} máxima para as fermentações com levedura selecionada.

Casca	Coeficientes						r	F
	a	b	c	d	e	f		
Ausente	5,03	2,57	-0,50	0,90	-1,42	0,55	0,981	0,846
Presente	6,75	0,91	-1,19	1,16	1,04	0,05	0,730	0,904

Analisando a Tabela 4.6, nota-se que tanto a temperatura quanto o pH produzem um significativo efeito sobre a concentração de glicerol (C_{GLIC}). Para os ensaios com a levedura selecionada, observa-se que enquanto o pH tem um forte efeito na formação de glicerol nos cultivos sem casca, nos experimentos com casca o efeito da temperatura é ligeiramente mais importante. O efeito mais significativo do pH para os ensaios sem casca era esperado, isso porque alterando o nível de pH do meio modifica-se a concentração de SO_2 livre no meio (HASHIZUME, 2001), o qual sendo modificada interfere na produção de glicerol (NIEUWOUDT, 2002). Isso é relevante visto que os ensaios realizados sem casca apresentavam um teor mais elevado de $K_2S_2O_5$. Deve-se destacar que esse fato é possivelmente a razão pela qual o pH afeta mais significativamente a $PROD_{Et}$ nos experimentos sem casca, como mostram as tabelas 4.4 e 4.5.

Observa-se que os valores para o coeficiente de correlação (r), apesar de relativamente baixos para os ensaios com casca, são bastante significativos para os experimentos sem casca, indicando que a correlação de segunda ordem representa melhor os pontos experimentais dos ensaios realizados sem casca.



Com relação às figuras 4.47, verifica-se certa semelhança na forma das superfícies quando se comparam os experimentos com ou sem cascas. Além disso, nota-se novamente que as superfícies tendem a maximizar essa variável quando se fermenta em valores mais elevados de pH inicial e temperatura. Observa-se ainda que as superfícies de respostas descreveram melhor aos dados experimentais relativos à produtividade em etanol do que à concentração de glicerol, especialmente no ensaio com casca.

4.3.3 CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL ($C_{Ac.V}$)

Conforme mencionado anteriormente, as correlações para a variável resposta $C_{Ac.V}$ têm a mesma forma da Equação (4.1), entretanto a variável dependente é a $C_{Ac.V}$. Os coeficientes dessas correlações juntamente com os valores do coeficiente de correlação (r) e o teste F estão apresentados nas tabelas 4.7 e 4.8. Já os gráficos das superfícies de resposta para a concentração de acidez volátil estão

apresentados nas figuras 4.48 e 4.49. Deve-se salientar que para essa variável resposta foram utilizados os valores da acidez volátil coletados no vinho final, ou seja, 50 dias após o término da fermentação turbulenta.

Tabela 4.7 - Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta $C_{Ac.V}$ para as fermentações com levedura selvagem.

Casca	Coeficientes						r	F
	a	b	c	d	e	f		
Ausente	0,50	-0,05	0,04	-0,04	0,01	0,00	0,90	0,78
Presente	0,44	0,01	-0,02	0,06	-0,01	0,03	0,72	0,28

Tabela 4.8 - Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta $C_{Ac.V}$ para as fermentações com levedura selecionada.

Casca	Coeficientes						r	F
	a	b	c	d	e	f		
Ausente	0,60	-0,16	0,05	0,09	0,11	0,00	0,98	0,91
Presente	0,29	-0,10	0,07	0,09	0,07	-0,02	0,96	0,87

Verifica-se que, de maneira geral, a correlação de segunda ordem representou significativamente essa variável resposta. Entretanto, essa observação não é válida para as quatro correlações, visto que quando se trabalhou com a levedura selvagem na presença de casca, o coeficiente de correlação ainda foi relativamente baixo.

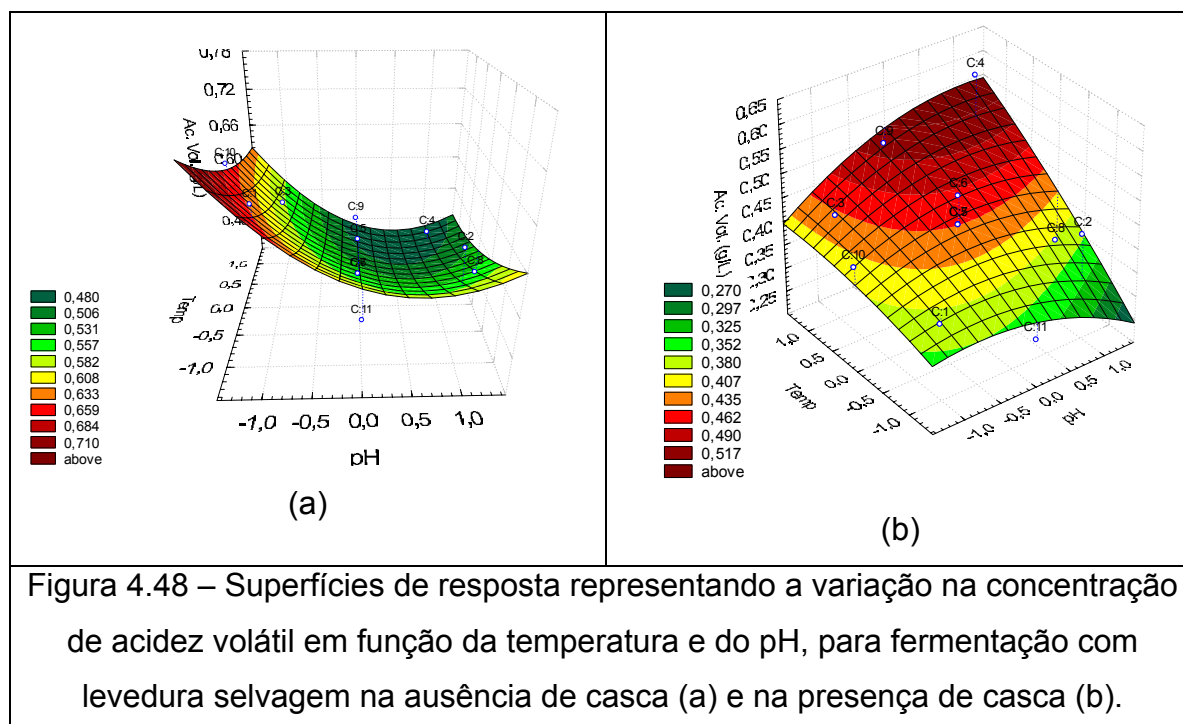
Como a ordem de grandeza da concentração de acidez volátil foi aproximadamente 10 vezes menor que a da concentração de glicerol, os valores dos coeficientes são também 10 vezes menores. Porém, mesmo assim, os fatores estudados nesse trabalho também apresentaram um efeito sobre essa variável resposta. Entretanto, não se pode dizer que um dos fatores teve maior influência do que o outro em nenhum caso, visto que todos os coeficientes estão na mesma ordem de grandeza.

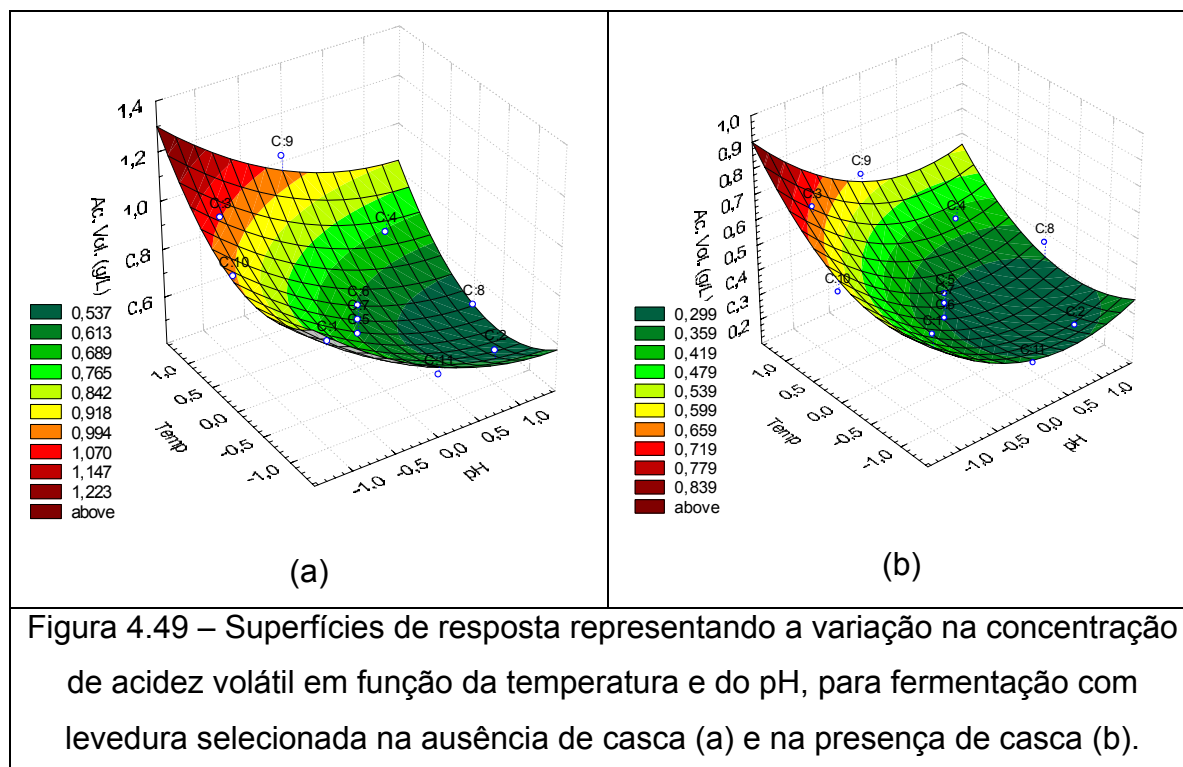
A Figura 4.49 mostra que as superfícies de respostas são muito semelhantes para os dois casos estudados com a levedura selecionada. Esse comportamento já era esperado, considerando-se que nesse caso a variação dos resultados foi mínima

e os sinais dos coeficientes foram os mesmos para todos os coeficientes. O mesmo não acontece quando se trabalhou com a levedura selvagem (Figura 4.48). Entretanto, devido à pequena diferença entre os valores apresentados para a acidez volátil nas tabelas 4.1 e 4.2, a diferença de perfil nas superfícies provavelmente está mais relacionada à dificuldade de ajuste do que a uma diferença entre os resultados.

Verifica-se que para todas as variáveis respostas analisadas, o coeficiente de correlação foi maior nas fermentações realizadas sem casca do que nas realizadas com casca. Uma possível explicação para esse fato é que na fermentação com casca existe uma maior dificuldade de homogeneização do que na ausência de casca, o que contribui para gerar uma maior variabilidade entre os experimentos.

Com relação aos valores apresentados pelos testes F, verifica-se que a probabilidade das correlações representarem significativamente os pontos experimentais é geralmente superior a 75%, exceção feita para as correlações representando as respostas $PROD_{Et}$ e $C_{Ac.v}$ em fermentações conduzidas com casca e levedura selvagem, o que reforça a dificuldade de se obter uma correlação confiável trabalhando nas condições mencionadas.





4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a otimização das condições de cultivo escolheu-se como função objetivo a maximização da produtividade em etanol e da produção de glicerol na fermentação turbulenta juntamente com a minimização da concentração da acidez volátil no vinho final. Empregando um algoritmo de otimização programado em Fortran (MOREIRA, 2004), que atribuía valores aleatórios às variáveis independentes das correlações geradas pelo programa “Statistica 5.1” e utilizando o método de multi-resposta baseado no fator de desejabilidade de cada resposta (BARROS *et al.*, 2002), otimizou-se simultaneamente as variáveis respostas, e deste modo determinou-se o valor ótimo de cada variável independente. Os valores otimizados são apresentados nas tabelas 4.9 e 4.10.

Outra observação importante que deve ser feita sobre a otimização diz respeito à escolha dos fatores de desejabilidade, aos quais nesse trabalho foram atribuídos valores iguais a 1. Esta escolha levou em consideração que não adiantava priorizar a maximização da produtividade de etanol e esquecendo de se minimizar o teor de acidez volátil, pois o produto final não apresentaria maior valor agregado se tivesse alto teor de etanol e alto teor de acidez volátil, mas sim não teria valor comercial para a comercialização como vinho. Os fatores de desejabilidade estão

representados pelas variáveis ALPHA e BETA no programa em Fortran, o qual está apresentado no Apêndice B. O programa incluído como exemplo no Apêndice B é referente à otimização dos experimentos com casca e levedura selecionada.

A Tabela 4.9 mostra que os valores ótimos obtidos para a fermentação com casca e sem casca são muito semelhantes para a levedura selvagem. Porém, deve-se ressaltar que devido ao método de otimização utilizar as correlações empíricas fornecidas pelo software “Statistica 5.1”, as quais não descrevem bem todos os dados experimentais, a otimização pode apresentar certo distanciamento da realidade. Isso fica evidente ao verificar que pela otimização o vinho proveniente da fermentação sem casca apresentou uma produtividade de etanol superior ao obtido pela fermentação com casca, resultado que não está coerente com os dados experimentais.

Além disso, nota-se na otimização dos polinômios que os valores máximos de produtividade de etanol e mínimos de concentração de acidez volátil foram obtidos próximo do maior pH estudado. Estes resultados da otimização reproduzem as preferências das leveduras, cujo metabolismo é favorecido em valores mais altos de pH. Entretanto, a literatura recomenda que o pH final do vinho seja inferior a 3,3 para garantir a sanidade do mesmo (PATO, 1998), de forma que a realização de fermentações vínicas no valor estimado pela otimização deve ser considerada com cautela. Isso ganha importância ao se constatar que, dos valores dos pH finais apresentados na Tabela 4.1, nenhum atingiu o valor de 3,3 para as fermentações com os maiores valores para o pH inicial. Assim, como os pH ótimos são maiores que o pH inicial do ponto central (3,3), recomenda-se cautela antes de implementá-los na prática, visto que os pH altos favorecem o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Com relação à temperatura ótima, observa-se que o valor estimado pela otimização para as fermentações com ou sem casca, para a levedura selvagem, foi a mesma (29,6 °C). Esse valor deve ser interpretado com cuidado, visto que em cultivos conduzidos com temperaturas relativamente altas o vinho pode perder suas qualidades organolépticas e contaminação, já que as temperaturas ideais para a produção de vinho branco empregando-se as uvas viníferas tradicionais é geralmente em torno de 15 a 18°C CATALUÑA (1984). Além disso, como visto nos resultados apresentados na Tabelas 4.1, as baixas temperaturas geralmente apresentaram no vinho final uma maior concentração de etanol, embora a

produtividade tenha sido favorecida em temperaturas mais altas devido à diminuição do tempo de fermentação.

Assim, como ocorreu com a otimização dos modelos para a levedura selvagem, o valor ótimo do pH inicial para as fermentações com levedura selecionada está muito próximo do maior valor experimental empregado no planejamento, cabendo-se assim as mesmas considerações feitas anteriormente. Entretanto, quando se analisa a otimização para o experimento com casca, nota-se que o pH ótimo já está bem próximo ao encontrado naturalmente no mosto da uva Itália, o que facilitaria sua implementação na prática. Já as temperaturas ótimas são relativamente altas, porém inferiores aos valores otimizados para as fermentações com leveduras selvagens.

Apesar da dificuldade em se obter correlações representativas, deve-se ressaltar a coerência dos valores otimizados com os experimentais, visto que a maior produtividade prevista pela otimização ocorre justamente em um ensaio com casca e com levedura selecionada, o que reflete, de forma superestimada, o melhor resultado experimental obtido para a produtividade (Ensaio 42 , Tabela 4.2).

Tabela 4.9 - Valores máximos para das variáveis respostas concentração de etanol e concentração de glicerol e valores mínimos para a variável resposta acidez volátil nas condições de cultivo otimizadas com levedura selvagem.

Casca	X_1	pH	X_2	Temp. (°C)	$PROD_{Et}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Glicerol (g/L)	Ac. Volátil (g/L)
Ausente	1,41	3,72	1,40	29,60	1,46	-----	0,472
Presente	1,23	3,67	1,40	29,60	1,40	-----	0,462

Tabela 4.10 - Valores máximos das variáveis resposta concentração de etanol e glicerol e valores mínimos para a variável resposta acidez volátil nas condições de cultivo otimizadas com levedura selecionada.

Casca	X_1	pH	X_2	Temp. (°C)	$PROD_{Et}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Glicerol (g/L)	Ac. Volátil (g/L)
Ausente	1,42	3,73	0,60	26,40	1,51	8,17	0,459
Presente	0,57	3,47	1,00	28,00	1,80	9,22	0,415

4.5 DADOS OBTIDOS NA VINÍCOLA

Para efeito de comparação como os resultados obtidos no laboratório e principalmente para verificar a viabilidade de se implementar as modificações propostas na prática foram realizados 4 experimentos na Vitivinícola Góes. Os valores obtidos para o vinho final assim como outros dados importantes para a discussão estão apresentados na Tabela 4.11. Todos os pontos experimentais coletados durante as 72 horas iniciais de cada experimento estão no Apêndice A nas tabelas A45 a A48.

As figuras 4.50 a 4.53 ilustram o comportamento da concentração de etanol, glicerol e A.R.T., além dessas concentrações essas figuras mostram também a variação da temperatura e do pH durante os ensaios. A variação da temperatura foi analisada uma vez que a Vitivinícola Góes não tem tanques de fermentações com um sistema de controle de temperatura.

É importante salientar que os mostos de uva Itália utilizados nos experimentos realizados no DEQ-UFSCar foram coletados na safra de 2004, já os empregados na Vitivinícola Góes são da safra 2005. A principal diferença que se pode notar entre esses dois mostos se refere ao grau de maturação da uva utilizada, ou seja, a diferença da concentração de açúcares, pois enquanto o mosto da safra 2004 apresentava 13,5°Brix o da safra 2005 apresentou 12,3°Brix. Apesar dessa diferença, a chaptalização foi realizada da mesma forma, ou seja, foram adicionados 50g de açúcar por litro de mosto. Desta forma, a concentração de açúcares redutores totais no início das fermentações realizadas na vinícola não foi superior a 170g/L.

Analisando as figuras 4.50 a 4.53 nota-se claramente a maior dificuldade da levedura selecionada iniciar a fermentação em um mosto com alta concentração de $K_2S_2O_5$. Isso já não é notado para as leveduras selvagens, visto que não houve praticamente diferença entre o tempo de fase lag quando se trabalhou com casca (Figura 4.50) ou sem casca (Figura 4.52). Apesar de a levedura selecionada ter apresentado grande dificuldade de fermentar o mosto sem casca, o mesmo problema não se verifica quando nas fermentações com casca.

Entretanto, nota-se também nas figuras 4.50 a 4.53 que quando as fermentações com as leveduras selecionadas entraram na fase exponencial, a taxa de consumo de A.R.T foi superior à apresentada pelas leveduras selvagens. Isso é comprovado analisando os valores apresentados na Tabela 4.11 para a variável

PROD_{Et} dos experimentos V-1 e V-2, onde a produtividade em etanol utilizando a levedura selecionada (V-2) foi superior a apresentada pela levedura selvagem.

Outro fato observado nessas figuras é a grande variação de temperatura que ocorre nas fermentações, chegando até a 10°C. Além disso, nota-se que a temperatura inicial das fermentações sem casca é um pouco superior à das fermentações com casca. Entretanto, a máxima temperatura atingida nas fermentações sem casca foi inferior à máxima atingida nas fermentações com casca, sugerindo que o aumento do teor de K₂S₂O₅ faz com que fermentação ocorra mais lentamente e a temperatura do mosto também se eleve menos rapidamente.

A temperatura elevada no final da fermentação turbulenta provavelmente favoreceu a diminuição do teor de etanol no vinho final, como se verifica ao comparar os valores obtidos para a concentração de etanol após 72 horas de fermentação (tabelas A4.45 a A4.48) com os valores de Et_f da Tabela 4.11. Esse problema é observado quando A.R.T. ficou abaixo de 4g/L já nas primeiras 72 horas de fermentação. Nessa situação, o mosto fermentado foi descubado e a fermentação lenta foi iniciada em uma temperatura alta. Essa constatação é reforçada ao se comparar os dados obtidos na vinícola com os dos experimentos realizados no DEQ. Por exemplo, no ensaio 3 (o qual também apresentou um A.R.T menor que 4g/L após 72 horas), realizado sob controle de temperatura a 20°C, nota-se que ocorreu a perda de apenas 2g/L de etanol. Já para os ensaios realizados na vinícola, os quais tiveram uma temperatura de descube superior a 30°C a perda de etanol foi de 5g/L. Isso mostra que um sistema simples de resfriamento traria benefícios também para concentração de etanol no vinho final, pois se evitaria perdas por evaporação.

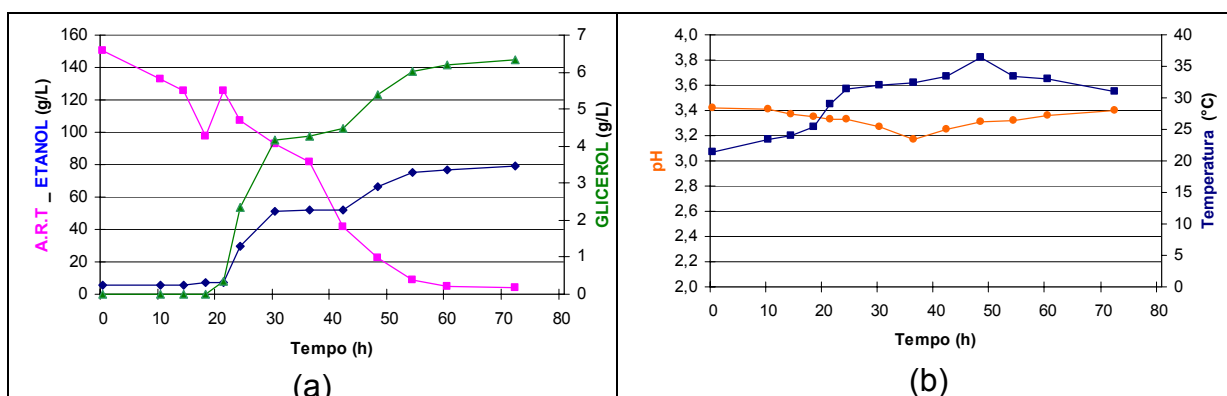


Figura 4.50 – Variação (a) da concentração de etanol (◆), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V– 1 (com casca e com levedura selvagem)

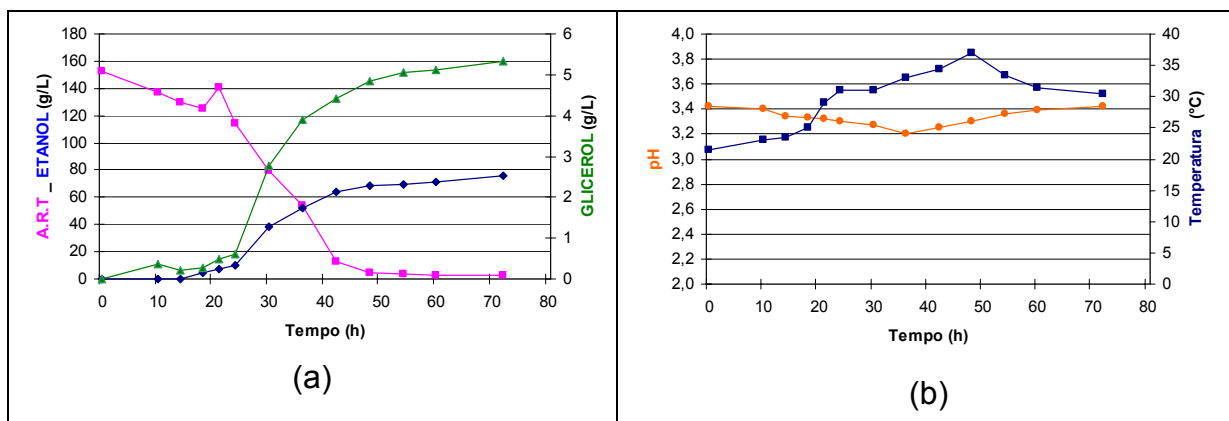


Figura 4.51 – Variação (a) da concentração de etanol (♦), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V- 2 (com casca e com levedura selecionada)

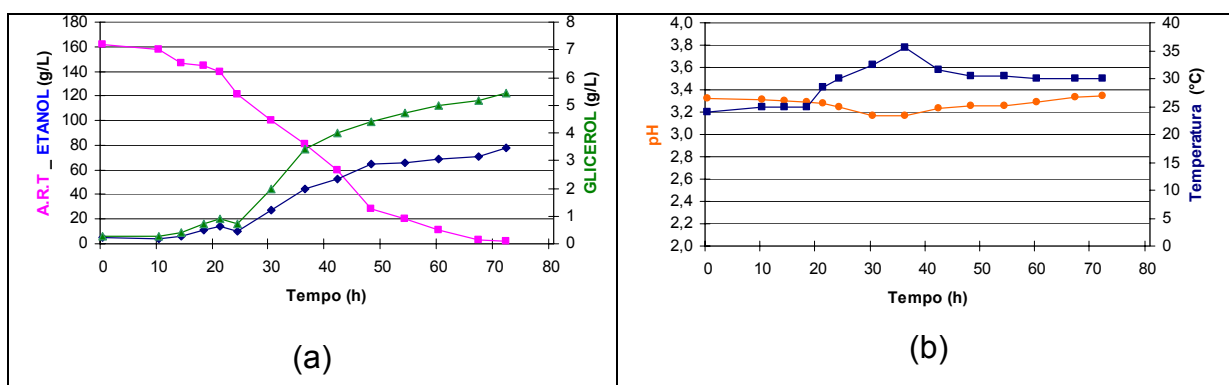


Figura 4.52 – Variação (a) da concentração de etanol (♦), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V- 3 (sem casca e com levedura selvagem)

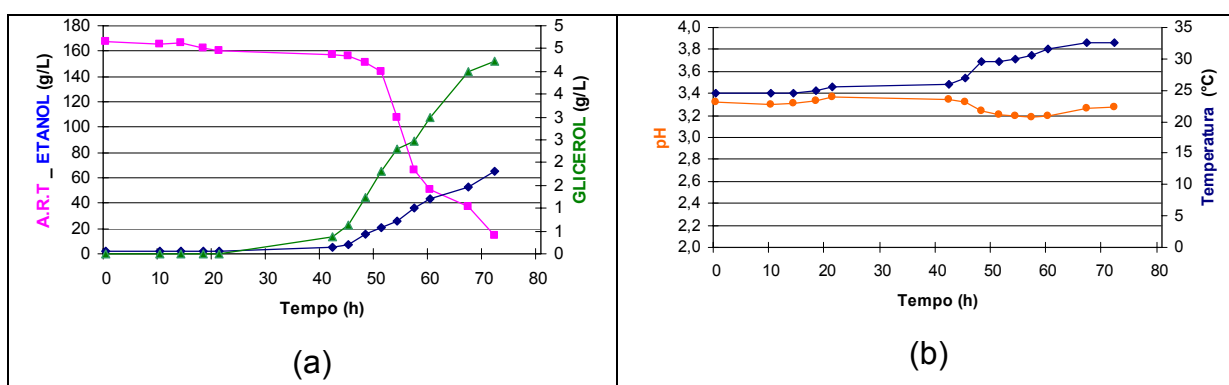


Figura 4.53 – Variação (a) da concentração de etanol (♦), glicerol (▲) e A.R.T. (■), (b) do pH (●) e da temperatura (■) durante o experimento V- 4 (sem casca e com levedura selecionada)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.11, o vinho produzido com a levedura selvagem e na presença de casca foi superior em todos os aspectos químicos analisados aos demais vinhos produzidos. Embora a produção de glicerol esteja de acordo com o comportamento observado nos ensaios de bancada, onde as fermentações com casca sempre apresentaram maior concentração de glicerol, chama atenção nos dados apresentados na Tabela 4.11 a superioridade e a excelente adaptação da levedura selvagem às condições empregadas na vinícola. Em fermentações realizadas com casca, os resultados referentes a todas as variáveis analisadas (C_{Et} , C_{Glic} e Ac. Vol) são melhores do que os obtidos pela levedura selecionada. Com isso fica evidente que para o vinicultor, nas condições empregadas, ainda é vantajoso utilizar o processo de pé-de-cuba. Entretanto as leveduras selecionadas certamente apresentariam a conveniência de, se utilizadas na primeira dorna, acelerarem o início da fermentação da primeira dorna, visto que o preparo do pé-de-cuba a partir das leveduras natural da uva (descrito no item 2.6.4.1) é demorado.

Além disso, nota-se na Tabela 4.11 que as concentrações da acidez volátil são relativamente baixas e, também se verifica que o pH final apresentado pelos 4 vinhos está na faixa que lhes permitem manter uma boa sanidade. Com isso nota-se que mesmo trabalhando com uvas de baixa qualidade, as quais apresentam baixo custo, é possível obter bons resultados, o que mostra o grande potencial dessa uva ser utilizada como matéria prima pelas vinícolas de São Roque.

Apesar dos vinhos provenientes das fermentações com casca apresentarem melhores resultados para a concentração de etanol, glicerol e acidez volátil do que os realizados na ausência de casca, eles também apresentaram uma cor amarela muito intensa, chegando a ter tons de vinho rose. Já o aspecto visual do vinho sem casca apresentou-se bastante agradável, com coloração mais suave. As fotos reproduzidas na Figura 4.54 de garrafas contendo o vinho final obtido a partir de fermentação com casca (Exp. V-2) e sem casca (Exp. V-4), ambos produzidos com levedura selecionada na Vitivinícola Góes, ilustram claramente a diferença de coloração mencionada anteriormente. A coloração suave é uma característica fundamental para a comercialização do produto e para a redução dos custos do processo de clarificação necessário para o acabamento do vinho final.

No entanto, apesar do vinho de uva Itália sem casca apresentar um aspecto mais agradável, antes da implementação deste tipo de processo na vinícola seria necessário realizar um número maior de ensaios sem casca e na vinícola assim como um estudo mais detalhado sobre a análise sensorial dos vinhos produzidos. Outra questão de fundamental importância para a viabilidade econômica da vinificação na ausência de casca refere-se à perda de mosto quando se promove a separação da casca. Entretanto, uma solução para esse problema seria promover a recarga desse tanque, ou seja, em cima do bagaço do qual se retirou o mosto para a vinificação em branco, adiciona-se novamente mais uva esmagada e se promoveria uma vinificação em tinto. O vinho assim obtido poderia ser misturado em algum vinho tinto e utilizado para a produção de vinho tinto de mesa suave, o qual representa a maior parcela do mercado paulista. Isso poderia tornar aceitável o custo da produção de um vinho branco de melhor qualidade.



Tabela 4.11 – Resultados do vinho final obtido na Vitivinícola Góes

EXP	t _M (h)	Et _i (g/L)	Et _m (g/L)	Et _f (g/L)	PROD _{Et} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Glic _i (g/L)	Glic _m (g/L)	Glic _f (g/L)	Ac.Vol (g/L)	A.R.T _i (g/L)	A.R.T _m (g/L)	A.R.T _f (g/L)	η _{P/S}	pH final
V-1	54	5,47	75,08	74,70	1,29	0,00	6,03	6,15	0,42	150,04	9,12	2,95	0,49	3,33
V-2	48	0,22	68,91	70,90	1,43	0,00	4,83	5,16	0,84	152,62	4,84	2,00	0,46	3,34
V-3	72	4,64	77,20	69,30	1,01	0,27	5,97	5,02	0,54	161,93	2,20	2,48	0,45	3,35
V-4	72	2,11	62,86	70,50	0,84	0,00	4,16	4,74	0,54	167,51	13,96	2,01	0,40	3,29

Onde V-1: fermentação com casca e levedura selvagem; V-2 fermentação com casca e levedura selecionada; V-3 fermentação sem casca e levedura selvagem e V-4 fermentação sem casca e levedura selecionada.

Tabela 4.12 – Resultados do na vinícola (V-1 a V-4) e no laboratório (9, 20, 31e 42), em condições de fermentação similares.

EXP	pH	T (°C)	t _M (h)	Et _M (g/L)	Et _f (g/L)	PROD _{Et} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Glic _M (g/L)	Glic _f (g/L)	Ac.Vol (g/L)	A.R.T _M (g/L)	A.R.T _f (g/L)	η _{P/S}	pH final
V-1	3,17 - 3,42	21,5 – 36,5	54	75,08	74,70	1,29	6,03	6,15	0,42	9,12	2,95	0,49	3,33
V-2	3,20 - 3,42	21,5 – 37,0	48	68,91	70,90	1,43	4,83	5,16	0,84	4,84	2,00	0,46	3,34
V-3	3,34 - 3,17	24,0 – 35,5	72	77,20	69,30	1,01	5,97	5,02	0,54	2,20	2,48	0,45	3,35
V-4	3,18 - 3,32	24,5 – 32,5	72	62,86	70,50	0,84	4,16	4,74	0,54	13,96	2,01	0,40	3,29
20	3,3	30	48	67,05	86,75	1,40	----	5,43	0,48	4,47	1,68	0,38	3,37
42	3,3	30	43	70,20	72,10	1,57	7,68	8,15	0,6	3,54	1,23	0,39	3,23
9	3,3	30	72	58,60	86,97	0,81	----	3,98	0,48	16,38	1,27	0,32	3,32
31	3,3	30	72	4,53	75,20	0,00	0,55	6,09	0,96	166,58	2,31	0,06	3,38

Para uma melhor comparação das semelhanças e diferenças entre a produção de vinho nas condições da vinícola e nas do laboratório, dados experimentais como a concentração de etanol, de glicerol, de acidez volátil, a produtividade em etanol e outros, estão relacionados na Tabela 4.12, juntamente com os valores das mesmas variáveis em ensaios realizados na vinícola. Como na vinícola, na maior parte do tempo as fermentações ocorrem em temperaturas superiores a 30°C, os ensaios de bancada escolhidos (9, 20, 31 e 42) foram realizados à temperatura de 30°C.

Os valores para as produtividades em etanol são coerentes, visto que o experimento realizado com casca e levedura selecionada apresentou os maiores valores de tanto na prática quanto no laboratório. Outro ponto que destaca a coerência dos dados obtidos no laboratório e na vinícola referentes a t_M , visto que praticamente foram os mesmos.

Além disso, a Tabela 4.12 ilustra também que os experimentos realizados sem casca e levedura selecionada (V-4 e 31) foram os que tiveram maior dificuldade de ocorrer, ressaltando o problema de se trabalhar com a levedura selecionada quando se tem alto teor de $K_2S_2O_5$.

Assim, nota-se os resultados obtidos no laboratório tem grande aplicabilidade, favorecendo a argumentação para se promover mudanças para a melhora do processo fermentativo na Vitivinícola Góes. Além disso, mostra a importância de se tentar buscar uma melhor adaptação da levedura selecionada para as fermentações com alto teor de $K_2S_2O_5$, uma vez que elas têm uma maior produtividade de etanol quando as fermentações ocorrem normalmente, além de apresentarem no geral uma maior produção de glicerol.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a formação de etanol em média foi de 74,79g/L (ensaios de bancada) e de 71,35g/L (ensaios na Vinícola) para o fermentado sem casca, que é superior ao mínimo exigido pela legislação brasileira para que um fermentado seja classificado como vinho de mesa. Juntamente com os baixos valores para a concentração da acidez volátil e a satisfatória produção de glicerol, mostrou-se que a produção de vinho branco a partir de uvas da variedade Itália tem grande potencial de ser utilizada pelas vinícolas de São Roque tanto na elaboração de vinho de mesa seco quanto para o vinho de mesa suave.

O desenvolvimento de um procedimento simples para o preparo do mosto isento de cascas e os resultados superiores obtidos (maiores concentrações de etanol) neste meio de cultivo ilustram a importância da experimentação de novos procedimentos para a melhoria da qualidade do produto. No entanto, o aproveitamento do volume de mosto retido nas cascas separadas por flotação é fundamental para viabilizar economicamente o procedimento proposto.

O desempenho das leveduras selecionadas foi abaixo das expectativas, devido à maior sensibilidade ao alto teor de sulfito presente no mosto. Infelizmente, devido à baixa qualidade da uva não se pode promover uma sulfitagem menos enérgica do que a promovida nos experimentos. Isso impossibilitaria a separação da casca do mosto antes do início da fermentação turbulenta, além de elevar o risco de se produzir um vinho com elevado teor de acidez volátil. Entretanto uma maneira barata de se promover uma melhora no processo fermentativo e que pode ser aplicada de maneira simples na Vitivinícola Góes é aumentar um pouco a quantidade de inóculo no início da fermentação, pois as fermentações nos ensaios iniciaram-se com 5% de inóculo, sendo recomendado pela literatura uma quantidade inicial de 3% (HASHIZUME, 2001) a 10% (PATO, 1998). Deve-se ressaltar ainda que enquanto as leveduras selvagens utilizadas como inóculo já estavam adaptadas ao sulfito, as leveduras selecionadas foram ativadas em uma concentração de 200mg/L de sulfito e pH 3,4 e transferidas para o meio fermentativo sem nenhuma etapa intermediária de adaptação. Desta forma, seria interessante investigar se a inclusão de uma estratégia para promover a adaptação gradativa da levedura selecionada na presença de sulfito e baixo pH durante a preparação do inóculo

poderia contribuir para se aproveitar todo o potencial desta levedura para a produção de vinho a partir de uvas de baixo custo.

Analisando os coeficientes dos modelos empíricos ajustados, verificou-se que as variáveis independentes pH inicial e temperatura afetaram as variáveis de resposta estudadas (concentração de etanol, glicerol e acidez volátil), entretanto seus efeitos sobre as variáveis respostas foram fortemente influenciados pela presença ou ausência da casca na fermentação.

Conclui-se ainda, a partir dos resultados experimentais e dos valores otimizados, que mesmo para um vinho de uva Itália um sistema de resfriamento traria benefícios apreciáveis na qualidade do produto final.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Em seguida, são apresentadas algumas sugestões para trabalhos posteriores, de modo a se aprimorar o conhecimento científico acerca da produção de vinho a partir da uva Itália.

- Estudar a influência da sulfitação nas características do vinho e também na seleção que essa etapa do processo promove nos microrganismos que estão presentes no próprio meio;
- Desenvolver um estudo a fim de descrever qual o melhor intervalo de tempo necessário para a aeração do vinho, a fim de que se encontrar uma otimização entre estímulo ao crescimento celular e produção de etanol;
- Estudar um processo para minimizar a perda de mosto devido à separação da casca antes da fermentação;
- Estudar o processo de clarificação tendo como objetivo a produção de vinho para corte;
- Realizar uma análise sensorial dos resultados obtidos;
- Obter uma correlação que descreva a concentração celular em função da concentração de etanol;
- Implementar um procedimento de adaptação da levedura selecionada ao alto teor de sulfito e baixo pH na preparação do inóculo;
- Isolar leveduras selvagens e selecionadas em diferentes estágios do processo (ao final das 72 horas de fermentação inicial, após a segunda trasfega e antes da filtração) visando investigar as suas características e estabelecer uma estratégia de constante aprimoramento do microrganismo utilizado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, J.C.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory micology**. 4. ed. New York: Editora John Wiley, 1996.

BADINO JUNIOR, A. C.; HOKKA, C. O. Laboratory experiment in biochemical engineering: ethanol fermentation. **Chemical Engineering Education**, p. 54-70. 1999.

BALLI, A. *et al.* Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. **Process Biochemistry**, v. 39, p.499-506, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2002.

BLINDER, F.; VOGES, E; LAUGE, P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. **Food Additives Contam**, v. 5, n. 3, p. 343-351, 1988.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. New York: Wiley-Interscience, 1978.

BRASIL. Lei Nº 7.678 de 8 de novembro de 1988. A produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**. Brasília, 9 nov. 1988.

BRASIL. Lei Nº 10.970 de 12 novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei Nº 7.678 de 8 de novembro de 1988. A produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 nov. 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria Nº 270, 17 de novembro de 1988. Altera os grupos de variedades constantes do Artigo 4º das Normas e Padrões de Qualidade da Uva para fins industriais, aprovadas pela Portaria MA Nº 1.012, de 17-11-1978. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria270.htm>. Acesso em: 20 dez. 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria Nº 229, 25 de outubro de 1988. Aprova a complementação dos padrões de identidade e qualidade para o vinho, referidos no decreto Nº 73.267 de 06-12-1973. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm>. Acesso em: 23 jan. 2005.

CATALUÑA, E. **Uvas e vinhos.** Rio de Janeiro: Editora Globo, 1984.

DARIAS-MARTIN, J.; DÍAZ-GONZÁLES, D.; DÍAZ-ROMERO, C. Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. **Journal of Food Engineering**, n. 63, p. 335-340, 2004.

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

DORIA FILHO, U. **Introdução a bioestatística para simples mortais.** São Paulo: Negócio Editora Ltda, 2001.

FALCONE, M.; MARQUES, A. B. Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, v. 4, p. 24-30, 1965.

FLEET, G. H. The microorganisms of winemaking: isolation enumeration and identification. In: FLEET, G. H. **Wine microbiology and biotechnology.** Chur: Harwood Academic Publishers, p. 1-27, 1993.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, n. 86, p. 11-22, 2003.

GÓES, F. J. **Influência do pH e da temperatura nas características do vinho produzido a partir da uva variedade Itália**. 2003. Trabalho de Graduação apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Editora Marcel Dekker, 1989.

HASHIZUME, T. Tecnologia do Vinho. In: BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 4, p. 21-68, 2001.

HIMMELBLAU, D. M. **Process analysis by statistical methods**. New York: Editora John Wiley & Sons, 1970.

JURAN, J. M.; GRZYNA, F. M. **Controle de qualidade handbook**. São Paulo: Editora Makron Books; Mc Graw-Hill, v 6, 1992.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 3, p. 1-43, 2001.

LUBBERS, S.; VERRET, C.; VOILLEY, A. The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine. **Academic Press**, v. 34, p. 362-365, 2001.

KUHN, G. B. *et al.* **O cultivo da videira informações básicas**. 2. ed. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1996. (EMBRAPA-CNPV. Circular Técnica, 10).

MARTIN, J. D.; GONZÁLES, D. D.; ROMENO, C. D. Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. **Journal of Food Engineering**, v. 13, 2003.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999.

MELLO, L. M. R. Produção e comercialização de uvas e vinhos. Disponível em: <<http://scarlet.cnpuv.embrapa.br/prod/uva/mercado.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2003.

MELLO, L. M. R. Produção e comercialização de uvas e vinhos: panorama 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/midialoiproduva2004.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 326-428, 1959.

MOREIRA, A. M. Estudo do processo PSA na separação de etanol-água. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 31., 2004, Uberlândia. **Anais do XXXI Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados**. Uberlândia, MG, 2004.

MORETTO, E. *et al.* **Vinhos e vinagres: processamento e análises**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1988.

MORITA, T; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes (padronização, preparação e purificação)**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1972.

MYERS, R. H. **Response surface methodology**. Boston: Allyn and Bacon, 1976.

NIEUWOUDT, H. *et al.* Glycerol and wine quality: fact and fiction. **WineLand** (Wynboer – A technical Guide for Wine Producers), 2002.

OLIVEIRA, A. C. B. *et al.* Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos?. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, 2002.

PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 10. ed. Lisboa: Clássica Editora, 1998.

RAVEN, P. H. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001;

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M.C.; MANFREDINI, S. **Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade**. 3. ed. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 1996.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: basic concepts**. New Jersey: Prentice Hall, 1992.

SIMONETTA, A. C. **Apunte I: enzimologia y energética microbiana**. Santa Fé: Editora da F.I.Q – U.N.L, 1990.

SPIEGEL, M. R. **Coleção Schaum: probabilidade e estatística**. São Paulo: Editora Mc Graw-Hill do Brasil, 1978.

TORIJA, M. J. *et al.* Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p. 127-136, 2003.

TROVATI J. **Produção de etanol a partir de amido utilizando levedura e amiloglicosidase coimobilizadas em gel de pectina**. 2001. Dissertação (mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

YALÇIN, S. H.; OZBAS, Z. Y. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. **Process Biochemistry**, vol. 39, n. 10, p. 1285-1291, 2004.

APÊNDICE A

Tabela A.1 - Dados do Experimento 1 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=20°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,00	0,03	194,50	0,00	
2	6	3,06	0,03	196,36	0,00	
3	9	3,05	0,03	193,57	0,00	
4	12	3,06	0,04	191,71	0,00	
5	14,2	3,00	0,03	192,64	0,00	
6	18	3,03	0,04	191,71	0,00	
7	21	3,04	0,03	186,13	0,00	
8	24	3,02	0,04	168,44	0,00	
9	30	3,03	0,02	159,14	0,00	
10	36	3,04	0,05	155,60	0,00	
11	42	3,02	0,04	154,48	0,79	
12	48	3,01	0,16	149,64	3,68	
13	60	2,93	0,54	145,18	7,52	
14	72	2,88	0,60	134,01	15,52	
15	84	2,81	0,87	108,70	32,29	
16	96	2,88	0,84	68,87	49,35	
17	108	2,87	0,78	65,52	58,29	

Tabela A.2 - Dados do Experimento 2 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=20°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,60	0,04	198,22	0,00	
2	6	3,47	0,16	185,19	0,00	
3	9	3,46	0,39	179,61	0,00	
4	12	3,43	0,90	174,96	0,79	
5	15	3,38	0,75	166,58	2,11	
6	18	3,36	1,37	161,93	5,03	
7	21	3,30	1,52	157,28	5,40	
8	24	3,29	1,25	151,13	6,95	
9	30	3,24	1,08	132,52	15,25	
10	36	3,21	1,34	116,89	22,60	
11	42	3,21	1,11	95,30	31,45	
12	48	3,19	1,08	87,48	36,84	
13	60	3,22	1,17	56,95	48,82	
14	72	3,25	1,05	39,09	62,88	

Tabela A.3 - Dados do Experimento 3 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=28°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,00	0,02	195,43	0,00	
2	6	3,05	0,04	194,50	0,00	
3	9	3,06	0,03	196,36	0,00	
4	12	3,05	0,03	194,50	0,00	
5	15	3,01	0,04	193,57	0,00	
6	18	3,04	0,04	179,61	0,00	
7	21	3,02	0,05	174,03	0,00	
8	24	3,05	0,06	168,44	0,00	
9	30	3,04	0,06	161,93	0,00	
10	36	3,04	0,03	156,35	0,00	
11	42	3,03	0,02	152,62	0,00	
12	48	3,03	0,03	148,90	0,99	
13	60	2,93	0,87	130,29	11,30	
14	72	2,87	0,90	71,47	39,73	
15	84	2,88	1,28	35,74	55,70	
16	96	2,92	0,84	12,66	71,15	
17	108	2,93	0,66	3,72	75,25	

Tabela A.4 - Dados do Experimento 4 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=28°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,64	0,05	195,43	0,00	
2	6	3,59	0,27	174,96	0,52	
3	9	3,53	0,60	165,65	1,89	
4	12	3,45	1,08	145,18	3,10	
5	15	3,37	1,37	115,40	12,50	
6	18	3,32	1,58	107,02	15,14	
7	21	3,31	1,67	89,34	27,35	
8	24	3,27	1,82	83,38	31,35	
9	30	3,32	1,61	49,88	38,13	
10	36	3,31	1,85	34,25	48,59	
11	42	3,32	1,64	26,06	65,55	
12	48	3,34	1,73	14,52	70,50	
13	60	3,36	1,43	10,05	82,87	
14	72	3,42	1,28	7,45	83,77	

Tabela A.5 - Dados do Experimento 5 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,34	0,11	195,43	0,00	
2	6	3,32	0,13	194,50	0,00	
3	9	3,31	0,11	196,36	0,00	
4	15	3,30	0,17	193,57	0,00	
5	18	3,31	0,07	194,50	0,00	
6	21	3,30	0,13	188,92	0,00	
7	24	3,27	0,16	176,82	0,92	
8	31	3,20	0,52	168,44	2,19	
9	33	3,17	0,54	163,79	4,02	
10	36	3,15	0,59	141,46	6,17	
11	42	3,10	0,62	134,75	16,51	
12	48	3,11	0,58	99,02	27,98	
13	60	3,12	0,53	65,89	44,54	
14	72	3,16	0,56	40,58	56,85	

Tabela A.6 - Dados do Experimento 6 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,33	0,11	196,36	0,00	
2	6	3,30	0,11	193,57	0,00	
3	9	3,31	0,11	187,99	0,00	
4	15	3,29	0,16	186,13	0,00	
5	18	3,24	0,13	181,47	0,00	
6	21	3,28	0,23	177,75	0,90	
7	24	3,23	0,26	176,82	1,59	
8	31	3,17	0,52	137,73	6,49	
9	33	3,14	0,63	119,86	8,64	
10	36	3,12	0,61	116,14	11,67	
11	42	3,09	0,63	107,95	22,82	
12	48	3,10	0,59	99,76	31,58	
13	60	3,12	0,54	68,12	53,60	
14	72	3,16	0,50	37,60	59,60	

Tabela A.7 - Dados do Experimento 7 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,33	0,12	196,36	0,00	
2	6	3,31	0,13	193,57	0,00	
3	9	3,31	0,10	191,71	0,00	
4	15	3,29	0,13	190,78	0,00	
5	18	3,26	0,13	187,99	0,00	
6	21	3,29	0,17	186,13	0,00	
7	24	3,25	0,20	176,82	1,69	
8	30	3,17	0,49	171,24	3,60	
9	33	3,16	0,59	151,88	5,69	
10	36	3,13	0,60	122,84	8,77	
11	42	3,10	0,73	107,21	17,95	
12	48	3,09	0,58	98,65	24,79	
13	60	3,12	0,58	61,79	43,49	
14	72	3,15	0,59	37,23	56,70	

Tabela A.8 - Dados do Experimento 8 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,70	0,15	196,36	0,00	
2	6	3,67	0,22	186,13	0,00	
3	9	3,65	0,27	169,37	0,00	
4	12	3,60	0,39	152,62	0,00	
5	15,5	3,51	0,60	142,39	3,86	
6	18	3,49	0,99	137,73	6,40	
7	21	3,45	1,02	130,29	9,59	
8	24	3,45	1,22	126,57	14,62	
9	30	3,37	1,17	99,02	25,65	
10	36	3,36	1,14	78,92	34,78	
11	42	3,37	1,17	71,47	44,45	
12	48	3,38	0,90	64,77	48,71	
13	60	3,39	1,14	34,25	64,40	
14	72	3,43	1,02	17,12	73,50	

Tabela A.9 - Dados do Experimento 9 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=30°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,30	0,01	197,29	0,00	
2	8	3,31	0,02	191,71	0,00	
3	10	3,26	0,08	180,54	0,00	
4	13	3,23	0,07	172,17	0,00	
5	15	3,22	0,08	171,24	0,00	
6	18	3,24	0,08	167,51	0,00	
7	25	3,21	0,26	164,72	3,29	
8	31	3,08	0,63	141,46	10,47	
9	34	3,07	0,64	113,91	16,17	
10	37	3,03	1,04	99,02	17,62	
11	42	3,04	0,82	77,43	20,60	
12	48	3,05	0,64	74,45	30,83	
13	60	3,10	0,49	39,09	42,53	
14	72	3,12	0,42	16,38	58,60	

Tabela A.10 - Dados do Experimento 10 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=2,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	2,80	0,16	188,92	0	
2	6	2,76	0,13	189,85	0	
3	9	2,74	0,08	184,26	0	
4	12	2,82	0,11	181,47	0	
5	15,5	2,81	0,13	176,82	0	
6	21	2,82	0,09	173,10	0	
7	30	2,84	0,09	170,30	0	
8	36	2,83	0,06	170,49	0	
9	42	2,83	0,04	169,75	0	
10	45	2,82	0,03	170,49	0	
11	48	2,84	0,04	167,51	0	
12	60	2,83	0,03	168,26	0	
13	72	2,84	0,03	166,77	0	

Tabela A.11 - Dados do Experimento 11 - Sem Casca e Levedura selvagem (T=18°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,37	0,16	187,06	0,00	
2	6	3,35	0,16	172,17	0,00	
3	9	3,34	0,18	168,44	0,00	
4	12	3,33	0,19	167,51	0,00	
5	15,5	3,31	0,21	157,28	0,00	
6	18	3,31	0,30	152,62	0,53	
7	21	3,29	0,33	148,90	2,59	
8	30	3,24	0,54	144,43	8,74	
9	36	3,20	0,72	127,31	9,44	
10	42	3,19	0,99	110,19	14,74	
11	45	3,18	0,84	110,93	19,47	
12	48	3,22	0,81	107,95	22,77	
13	60	3,15	0,87	99,39	45,01	
14	72	3,19	0,96	25,55	79,80	

Tabela A.12 - Dados do Experimento 12 - Com Casca e Levedura selvagem (T=20°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,00	0,01	177,75	0,00	
2	8	3,02	0,08	166,58	0,00	
3	10	3,01	0,12	154,48	0,00	
4	13	2,99	0,07	148,90	0,00	
5	15	2,96	0,10	169,37	0,71	
6	18	3,00	0,10	161,00	3,29	
7	25	2,93	0,40	152,62	11,09	
8	31	2,87	0,36	131,78	26,23	
9	34	2,83	0,40	116,14	32,00	
10	37	2,85	0,28	104,23	34,05	
11	42	2,84	0,42	74,45	43,15	
12	48	2,84	0,33	49,51	59,23	
13	60	2,86	0,13	26,43	69,75	
14	72	2,87	0,01	11,17	74,50	

Tabela A.13 - Dados do Experimento 13 - Com Casca e Levedura selvagem (T=20°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,59	0,11	195,43	0,00	
2	7	3,59	0,08	192,64	0,00	
3	10	3,56	0,12	186,13	0,00	
4	13	3,47	0,19	187,06	0,00	
5	16	3,41	0,29	180,54	0,00	
6	19	3,39	0,23	176,82	2,12	
7	22	3,32	0,48	169,37	6,09	
8	25	3,31	0,39	148,90	13,98	
9	32	3,20	0,27	108,70	17,25	
10	37	3,18	0,26	89,34	23,63	
11	42	3,18	0,33	77,43	30,78	
12	48	3,20	0,36	53,60	46,30	
13	60	3,22	0,08	22,71	59,75	
14	72	3,24	0,01	11,35	74,60	

Tabela A.14 - Dados do Experimento 14 - Com Casca e Levedura selvagem (T=28°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,00	0,01	179,61	0,00	
2	8	3,01	0,04	172,17	0,00	
3	10	2,97	0,04	165,65	0,00	
4	13	2,97	0,02	158,21	0,00	
5	15	2,99	0,02	161,93	0,00	
6	18	3,01	0,02	151,69	0,35	
7	25	2,95	0,25	139,59	6,48	
8	31	2,90	0,26	87,85	24,83	
9	34	2,88	0,26	72,96	31,60	
10	37	2,86	0,27	58,82	50,18	
11	42	2,87	0,23	44,67	58,60	
12	48	2,90	0,17	31,27	60,38	
13	60	2,90	0,07	4,47	69,05	
14	72	2,87	0,01	3,72	76,30	

Tabela A.15 - Dados do Experimento 15 - Com Casca e Levedura selvagem (T=28°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,60	0,11	195,43	0,00	
2	7	3,57	0,14	187,99	0,00	
3	10	3,55	0,21	177,75	0,79	
4	13	3,44	0,21	161,93	3,50	
5	16	3,32	0,22	128,43	8,05	
6	19	3,27	0,26	112,61	15,23	
7	22	3,24	0,53	92,13	26,56	
8	25	3,22	0,30	68,49	33,10	
9	32	3,23	0,19	43,18	48,58	
10	35	3,25	0,00	26,06	52,20	
11	37	3,27	0,10	16,38	54,35	
12	42	3,25	0,10	7,07	56,65	
13	48	3,29	0,01	3,72	61,00	
14	60	3,33	0,04	1,12	65,20	
15	72	3,36	0,01	0,56	65,95	

Tabela A.16 - Dados do Experimento 16 - Com Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,27	0,15	191,71	0,00	
2	9	3,10	0,10	184,26	0,00	
3	12	3,07	0,09	176,82	0,97	
4	15	3,03	0,14	173,10	4,41	
5	18	3,00	0,18	167,51	6,97	
6	21	2,97	0,15	150,76	13,49	
7	24	2,98	1,08	106,09	19,40	
8	31	2,95	0,49	75,19	35,93	
9	34	2,95	0,24	71,47	38,55	
10	37	2,98	0,19	67,75	42,08	
11	43	2,98	0,11	48,39	48,03	
12	49	3,00	0,13	30,90	58,90	
13	60	2,99	0,05	11,91	70,95	
14	72	3,05	0,04	2,79	74,65	

Tabela A.17 - Dados do Experimento 17 - Com Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,28	0,16	179,61	0,00	
2	9	3,09	0,13	175,89	0,00	
3	12	3,07	0,10	165,65	0,00	
4	15	3,02	0,10	158,21	1,99	
5	18	3,00	0,16	147,04	6,29	
6	21	2,96	0,14	129,36	12,82	
7	24	2,96	0,76	120,05	19,12	
8	31	2,96	0,18	90,08	34,95	
9	34	2,93	0,22	87,11	35,05	
10	37	2,98	0,18	68,49	40,70	
11	43	2,97	0,14	47,65	48,28	
12	49	3,00	0,14	30,15	56,80	
13	60	2,99	0,02	11,91	66,80	
14	72	3,04	0,01	2,98	68,40	

Tabela A.18 - Dados do Experimento 18 - Com Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,28	0,16	187,06	0,00	
2	9	3,10	0,12	186,13	0,00	
3	12	3,08	0,09	184,26	0,97	
4	15	3,04	0,12	164,72	3,51	
5	18	3,01	0,18	161,00	7,46	
6	21	2,98	0,17	130,29	11,76	
7	24	2,98	0,96	105,16	16,18	
8	31	2,96	0,35	84,13	31,23	
9	34	2,95	0,23	64,03	33,13	
10	37	2,98	0,16	58,07	36,50	
11	43	2,98	0,11	35,74	48,93	
12	49	3,00	0,16	26,06	56,18	
13	60	3,00	0,03	9,68	60,80	
14	72	3,05	0,02	3,91	70,35	

Tabela A.19 - Dados do Experimento 19 - Com Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=3,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,75	0,16	184,26	0,00	
2	7	3,61	0,11	174,96	0,00	
3	10	3,55	0,12	162,86	0,81	
4	13	3,50	0,13	161,93	1,99	
5	16,5	3,42	0,34	135,87	6,89	
6	19	3,39	0,20	116,33	13,26	
7	22	3,33	0,76	98,65	26,49	
8	24	3,33	0,46	95,30	29,11	
9	32	3,32	0,27	64,77	47,73	
10	36	3,37	0,27	49,14	49,68	
11	41	3,35	0,19	38,71	53,88	
12	48	3,37	0,10	15,26	58,18	
13	60	3,39	0,25	2,98	66,10	
14	72	3,38	0,03	2,61	76,85	

Tabela A.20 - Dados do Experimento 20 - Com Casca e Levedura selvagem (T=30°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,31	0,18	182,40	0,00	
2	7	3,26	0,11	175,89	0,00	
3	10	3,18	0,19	172,17	2,39	
4	13	3,14	0,21	150,76	7,37	
5	16,5	3,08	0,28	121,91	15,59	
6	19	3,07	0,36	108,88	21,69	
7	22	3,05	0,79	83,76	28,20	
8	24	3,05	0,59	76,68	29,48	
9	31	3,05	0,42	45,41	42,25	
10	36	3,10	0,63	16,38	60,05	
11	41	3,10	0,24	13,40	62,48	
12	48	3,13	0,17	4,47	67,05	
13	60	3,13	0,35	2,98	72,30	
14	72	3,14	0,34	2,23	76,85	

Tabela A.21 - Dados do Experimento 21 - Com Casca e Levedura selvagem (T=24°C e pH=2,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	2,85	0,17	197,29	0,00	
2	7	2,81	0,07	191,71	0,00	
3	10	2,81	0,09	175,89	0,80	
4	13	2,78	0,12	158,21	2,29	
5	16,5	2,74	0,18	154,48	8,09	
6	19	2,73	0,20	137,73	12,10	
7	22	2,70	1,06	116,33	15,02	
8	24	2,69	0,46	113,16	21,13	
9	32	2,68	0,59	72,96	40,63	
10	36	2,72	0,62	48,39	52,88	
11	41	2,70	0,54	43,18	55,90	
12	48	2,72	0,31	26,80	66,60	
13	60	2,71	0,16	8,19	70,43	
14	72	2,68	0,13	2,79	74,90	

Tabela A.22 - Dados do Experimento 22 - Com Casca e Levedura selvagem (T=18°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,28	0,05	181,47	0,00	
2	7	3,28	0,06	171,24	0,00	
3	10	3,27	0,05	161,00	0,00	
4	13	3,25	0,04	152,62	0,00	
5	16	3,21	0,09	147,97	0,00	
6	19	3,21	0,07	139,59	2,33	
7	22	3,17	0,54	110,74	6,07	
8	25	3,15	0,43	107,95	17,39	
9	32	3,10	0,38	102,00	20,35	
10	37	3,07	0,46	76,68	24,01	
11	42	3,03	0,45	67,01	31,95	
12	48	3,05	0,16	58,82	35,88	
13	60	3,05	0,07	36,48	44,65	
14	72	3,08	0,04	17,68	60,00	

Tabela A.23 - Dados do Experimento 23 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=20°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,01	0,22	172,17	3,99	0,33
2	11	2,99	0,17	170,30	4,19	0,39
3	15	2,98	0,18	168,44		
4	21	2,99	0,20	167,51		
5	24	2,97	0,26	166,58		
6	29	2,96	0,17	167,51		
7	33	2,96	0,14	166,58		
8	37	2,96	0,14	165,65		
9	45	2,98	0,20	166,58		
10	48	2,97	0,16	164,72		
11	54	2,96	0,09	164,72	4,46	0,48
12	72	2,96	0,14	165,65	4,52	0,48

Tabela A.24 - Dados do Experimento 24 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=20°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,60	0,19	174,96	4,96	0,45
2	11	3,56	0,24	169,37	5,30	0,69
3	15	3,55	0,25	162,86	6,50	0,90
4	21	3,53	0,53	158,21	10,14	1,30
5	24	3,46	0,79	151,69	14,68	1,76
6	29	3,40	1,08	141,46	18,61	2,21
7	33	3,37	1,20	125,63	21,01	2,28
8	37	3,35	1,31	119,12	39,73	3,56
9	45	3,35	1,49	94,92	41,88	3,77
10	48	3,34	1,88	84,69	47,28	4,32
11	54	3,34	1,52	72,22	52,30	4,50
12	60	3,34	1,49	71,10	52,86	4,71
13	72	3,35	1,22	51,37	60,26	5,33

Tabela A.25 - Dados do Experimento 25 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=28°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	2,99	0,30	184,26	4,94	0,53
2	9	2,98	0,44	183,33	4,23	0,44
3	12	2,98	0,30	180,54		
4	15	2,98	0,27	179,61		
5	21	3,00	0,23	178,68		
6	25	2,99	0,33	178,68	5,71	0,63
7	29	2,98	0,43	176,82		
8	36	2,99	0,38	174,96		
9	39	2,98	0,32	174,03		
10	48	3,00	0,22	174,03		
11	56	3,00	0,20	173,10		
12	60,5	3,01	0,17	173,10	5,70	0,66
13	72	3,00	0,16	171,24	5,09	0,61

Tabela A.26 - Dados do Experimento 26 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=28°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,62	0,36	183,33	4,35	0,42
2	9	3,51	1,02	157,28	9,70	1,30
3	12	3,44	1,55	141,46	19,15	2,44
4	15	3,39	1,58	120,98	22,35	2,99
5	21	3,35	2,06	73,52	45,15	4,99
6	25	3,34	2,57	57,70	48,83	5,58
7	29	3,34	2,66	45,79	54,30	6,29
8	36	3,37	2,12	19,73	62,65	7,19
9	39	3,39	2,15	13,59	63,05	7,28
10	48	3,40	1,40	2,05	72,10	7,67
11	56	3,42	1,64	1,64	77,01	7,60
12	60,5	3,42	1,22	1,60	79,86	7,72
13	72	3,42	0,78	1,58	80,47	7,81

Tabela A.27 - Dados do Experimento 27 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,32	0,21	174,96	4,67	0,48
2	12	3,31	0,24	173,10	5,10	0,52
3	24	3,31	0,25	173,10	5,43	0,64
4	31	3,29	0,53	166,58	8,43	0,90
5	35,5	3,24	0,80	155,41	11,04	1,07
6	39,5	3,19	1,06	139,59	17,16	1,71
7	46,5	3,16	1,10	116,33	23,31	2,39
8	49,5	3,15	1,02	106,09	37,99	3,24
9	54	3,14	1,05	81,90	42,01	3,58
10	60	3,16	1,20	68,87	54,60	4,27
11	63,5	3,17	1,34	56,95	56,65	4,57
12	70	3,20	1,17	39,09	67,37	4,60
13	72	3,21	0,63	34,25	72,38	4,74

Tabela A.28 - Dados do Experimento 28 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,31	0,23	174,96	4,05	0,41
2	12	3,31	0,28	173,10	4,49	0,43
3	24	3,31	0,33	172,17	4,87	0,46
4	31	3,30	0,51	163,79	5,55	0,63
5	35,5	3,24	0,80	156,35	12,98	1,39
6	39,5	3,18	0,97	138,66	16,11	1,79
7	46,5	3,16	1,14	108,88	34,69	2,62
8	49,5	3,16	1,22	96,79	37,00	2,97
9	54	3,15	1,14	76,31	40,08	3,67
10	60	3,16	1,46	63,65	53,35	5,11
11	63,5	3,17	1,17	52,12	56,40	5,15
12	70	3,22	0,90	36,11	66,74	5,20
13	72	3,23	0,87	31,27	70,51	5,39

Tabela A.29 - Dados do Experimento 29 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,31	0,27	174,03	4,74	0,53
2	12	3,31	0,33	173,10	5,55	0,62
3	24	3,31	0,35	172,17	6,21	0,66
4	31	3,29	0,45	165,65	7,51	0,82
5	35,5	3,26	0,74	162,86	10,57	1,14
6	39,5	3,21	0,90	148,90	15,45	1,59
7	46,5	3,17	0,95	117,26	29,07	2,64
8	49,5	3,17	1,11	112,61	29,36	2,70
9	54	3,15	1,22	88,41	37,66	3,28
10	60	3,15	1,14	71,47	49,45	4,36
11	63,5	3,16	1,28	58,07	53,70	4,40
12	70	3,20	0,81	40,58	64,64	4,67
13	72	3,21	0,78	31,27	65,93	4,94

Tabela A.30 - Dados do Experimento 30 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,73	0,40	183,33	4,31	0,46
2	9	3,65	0,61	176,82	6,65	0,95
3	12	3,60	0,89	166,58	10,15	1,33
4	15	3,55	1,00	161,00	13,34	1,68
5	21	3,43	1,73	119,12	26,22	3,05
6	25	3,37	1,97	109,81	31,31	3,12
7	29	3,34	2,36	90,27	39,44	4,02
8	36	3,34	2,09	66,63	49,93	4,98
9	39	3,32	2,18	57,33	55,90	5,53
10	48	3,35	2,06	34,06	59,15	6,28
11	56	3,37	1,94	18,61	71,27	6,56
12	60,5	3,37	1,64	6,70	77,78	6,69
13	72	3,37	1,14	4,65	78,76	6,83

Tabela A.31 - Dados do Experimento 31 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=30°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,30	0,23	171,24	4,20	0,40
2	11	3,28	0,14	170,30	4,15	0,40
3	15	3,26	0,25	170,30		
4	21	3,30	0,23	169,37		
5	24	3,28	0,26	168,44		
6	29	3,26	0,21	167,51		
7	33	3,26	0,25	166,58		
8	37	3,26	0,26	167,51		
9	45	3,26	0,21	168,44		
10	48	3,26	0,21	167,51		
11	60	3,25	0,17	168,44	4,35	0,41
12	72	3,25	0,16	166,58	4,53	0,48

Tabela A.32 - Dados do Experimento 32 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=2,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	2,79	0,24	172,17	4,35	0,55
2	10	2,79	0,19	170,30	4,68	0,55
3	16	2,79	0,19	171,24		
4	23	2,79	0,18	167,51		
5	33	2,80	0,20	168,44		
6	39	2,81	0,14	167,51		
7	46	2,82	0,17	167,51		
8	72	2,81	0,15	166,58	4,70	0,55

Tabela A.33 - Dados do Experimento 33 - Sem Casca e Levedura Seleccionada (T=18°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,32	0,24	171,24	4,16	0,47
2	10	3,32	0,25	167,51	4,61	0,48
3	16	3,31	0,28	164,72		
4	23	3,32	0,24	167,51		
5	33	3,31	0,20	165,65		
6	39	3,31	0,25	164,72		
7	46	3,31	0,24	166,58		
8	60	3,31	0,25	165,65	4,72	0,50
9	72	3,31	0,18	165,65	4,81	0,54

Tabela A.34 - Dados do Experimento 34 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=20°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,01	0,39	172,17	5,18	0,48
2	10	2,95	0,00	158,21	6,58	0,62
3	19,5	2,92	0,00	147,97	14,65	1,40
4	24,5	2,85	0,51	127,50	18,49	1,97
5	27,5	2,84	0,72	111,68	30,24	2,62
6	31,5	2,83	0,96	100,51	32,50	2,97
7	36	2,85	1,70	88,60	39,06	3,85
8	43,5	2,85	1,64	69,61	50,20	4,39
9	48	2,83	1,17	59,19	52,70	4,85
10	54	2,84	1,22	45,41	58,77	5,59
11	60	2,84	1,14	35,36	70,62	6,06
12	72	2,83	0,81	20,29	77,52	6,57

Tabela A.35 - Dados do Experimento 35 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=20°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,60	0,36	170,30	5,04	0,45
2	10	3,51	0,00	139,59	7,33	0,61
3	19,5	3,43	0,00	128,43	15,46	1,36
4	24,5	3,33	1,14	107,02	22,44	2,10
5	27,5	3,32	1,43	89,34	35,18	2,57
6	31,5	3,29	1,46	78,17	36,58	2,64
7	36	3,33	2,03	66,26	43,74	3,45
8	43,5	3,34	1,37	48,39	47,58	3,94
9	48	3,33	1,31	44,30	49,96	4,00
10	54	3,33	1,05	31,27	60,17	4,57
11	60	3,30	0,84	23,45	66,19	4,81
12	72	3,28	1,76	11,54	71,16	5,42

Tabela A.36 - Dados do Experimento 36 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=28°C e pH=3,0)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,02	0,25	176,82	3,79	0,42
2	7	2,88	0,15	174,96	7,42	0,82
3	10	2,87	0,29	162,86	9,13	1,07
4	13	2,85	0,71	149,83	12,43	1,43
5	16	2,81	1,01	125,63	21,18	2,42
6	19	2,81	1,14	107,02	27,13	3,27
7	22	2,80	1,31	90,08	36,93	3,91
8	25	2,84	1,88	72,22	44,46	5,03
9	31	2,79	1,70	49,14	52,50	6,47
10	37	2,84	1,46	30,15	62,10	7,15
11	43	2,86	1,88	16,57	68,25	8,04
12	49	2,86	1,46	6,51	70,41	8,33
13	60	2,84	0,14	4,02	72,94	8,47
14	72	2,85	0,03	3,76	75,72	8,47

Tabela A.37 - Dados do Experimento 37 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=28°C e pH=3,6)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,61	0,27	175,89	3,32	0,37
2	7	3,39	0,26	161,93	8,67	1,15
3	10	3,36	0,65	157,28	12,46	1,43
4	13	3,30	1,13	132,15	18,54	1,98
5	16	3,24	1,96	89,34	28,83	3,10
6	19	3,24	2,60	77,24	38,10	4,13
7	22	3,23	2,39	61,79	47,65	4,80
8	25	3,27	3,44	44,67	49,81	5,47
9	31	3,21	1,02	27,17	57,20	6,41
10	37	3,27	1,05	12,28	67,45	7,02
11	43	3,27	0,57	5,21	69,10	7,39
12	49	3,26	1,34	4,09	71,26	7,52
13	60	3,27	0,27	3,72	72,88	7,53
14	72	3,30	0,70	3,57	77,20	7,56

Tabela A.38 - Dados do Experimento 38 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,38	0,31	196,36	2,56	0,27
2	7	3,33	0,41	189,85	6,93	0,70
3	10	3,30	0,46	166,58	8,88	0,96
4	13	3,26	0,82	158,21	11,14	1,24
5	16	3,20	1,18	121,91	21,05	2,31
6	19	3,20	1,67	120,05	24,39	2,44
7	22	3,17	2,21	106,46	35,70	3,34
8	25	3,16	2,90	61,79	44,35	4,38
9	31	3,15	1,94	48,39	48,28	4,62
10	37	3,17	1,64	34,62	61,65	5,07
11	43	3,18	1,14	25,13	64,45	5,98
12	48	3,16	1,14	14,33	66,85	6,30
13	60	3,19	1,42	5,88	74,90	6,59
14	72	3,22	0,76	3,20	75,12	6,93

Tabela A.39 - Dados do Experimento 39 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,37	0,32	180,54	3,03	0,30
2	7	3,32	0,35	170,30	5,99	0,61
3	10	3,28	0,50	158,21	10,93	1,06
4	13	3,25	0,75	142,39	11,19	1,20
5	16	3,19	1,15	137,73	20,43	1,96
6	19	3,20	1,73	107,02	24,29	2,30
7	22	3,17	1,85	104,97	35,55	3,40
8	25	3,15	2,57	77,43	41,30	3,74
9	31	3,17	2,15	59,93	48,81	4,31
10	37	3,16	1,37	36,11	56,10	5,56
11	42	3,17	1,08	26,62	60,40	5,93
12	48	3,17	0,72	14,70	60,80	6,04
13	60	3,19	0,23	10,80	68,98	6,78
14	72	3,21	0,15	2,90	74,90	6,94

Tabela A.40 - Dados do Experimento 40 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,37	0,35	186,58	2,92	0,32
2	7	3,32	0,36	157,28	7,30	0,64
3	10	3,28	0,44	147,97	7,68	0,73
4	13	3,25	0,73	142,39	13,00	1,30
5	16	3,20	1,41	123,77	17,88	1,89
6	19	3,20	1,58	105,16	20,52	2,02
7	22	3,16	2,21	88,60	28,40	2,64
8	25	3,15	2,24	75,94	37,33	3,45
9	31	3,16	1,67	50,25	52,80	5,10
10	37	3,15	1,46	36,48	58,45	5,42
11	42	3,17	1,88	26,80	66,75	5,76
12	48	3,17	0,48	15,63	71,81	5,84
13	60	3,19	0,19	5,62	73,44	6,86
14	72	3,21	0,12	4,58	75,12	6,81

Tabela A.41 - Dados do Experimento 41 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=3,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,72	0,31	191,71	2,41	0,22
2	6	3,55	0,12	189,85	2,99	0,33
3	9	3,60	0,21	183,33	3,76	0,42
4	12	3,58	0,21	182,40	4,70	0,51
5	15	3,52	0,46	167,51	7,62	0,81
6	18	3,45	0,76	148,90	13,32	1,41
7	24	3,40	3,05	139,59	33,29	3,05
8	30	3,35	2,90	89,34	46,13	4,80
9	33	3,35	3,76	61,79	53,65	5,17
10	36	3,37	2,36	53,98	54,40	5,31
11	41	3,37	1,58	44,30	60,15	5,67
12	48	3,38	0,96	27,92	68,39	6,63
13	60	3,37	0,54	7,82	75,72	7,34
14	72	3,37	0,17	3,76	77,75	7,65

Tabela A.42 - Dados do Experimento 42 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=30°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,31	0,30	177,51	2,72	0,32
2	7	3,13	0,27	165,65	7,37	0,99
3	10	3,10	0,39	151,69	10,40	1,36
4	13	3,07	0,87	146,11	15,73	1,88
5	16	3,01	1,41	105,16	26,06	3,06
6	19	3,00	1,70	95,85	34,60	4,19
7	22	3,01	2,12	93,06	49,02	5,13
8	25	3,05	1,85	58,07	51,35	5,84
9	31	3,05	1,70	25,69	63,40	6,92
10	37	3,08	0,60	11,17	67,90	7,45
11	43	3,09	0,18	3,54	70,20	7,68
12	49	3,08	2,24	2,79	70,06	7,71
13	60	3,08	1,17	3,02	71,76	7,86
14	72	3,11	0,33	2,79	74,14	7,90

Tabela A.43 - Dados do Experimento 43 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=24°C e pH=2,8)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	2,87	0,37	191,71	3,05	0,24
2	6	2,90	0,22	193,57	3,58	0,32
3	9	2,88	0,15	191,71		
4	12	2,82	0,09	190,78		
5	15	2,85	0,13	186,13		
6	18	2,83	0,31	184,26		
7	24	2,83	1,70	177,75		
8	30	2,77	2,18	179,61		
9	33	2,71	2,63	176,82		
10	36	2,78	2,18	178,68		
11	41	2,78	1,97	176,82		
12	48	2,74	0,96	177,75		
13	60	2,77	1,17	175,89	5,55	0,67
14	72	2,80	0,17	175,89	6,37	0,73

Tabela A.44 - Dados do Experimento 44 - Com Casca e Levedura Seleccionada (T=18°C e pH=3,3)

Amostra	Tempo (h)	pH	Células (g/L)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,31	0,36	171,24	4,22	0,42
2	10	3,21	0,00	150,76	7,47	0,76
3	19,5	3,16	0,00	135,87	16,99	1,52
4	24,5	3,11	0,75	116,33	23,88	2,19
5	27,5	3,11	1,14	105,16	28,73	2,81
6	31,5	3,10	1,34	81,90	39,14	3,57
7	36	3,10	1,94	77,80	46,26	3,91
8	43,5	3,12	1,85	59,56	53,85	4,57
9	48	3,08	1,49	46,53	57,65	4,63
10	54	3,10	1,64	33,87	68,29	5,18
11	60	3,10	1,37	27,92	68,74	5,69
12	72	3,06	1,08	18,61	68,84	6,09

Tabela A.45 - Dados do Experimento V-1 - Com Casca e Levedura selvagem

Amostra	Tempo (h)	pH	Temp (°C)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,42	21,5	150,76	5,47	0,00
2	10	3,41	23,5	133,08	5,68	0,00
3	14	3,37	24,0	125,63	5,93	0,00
4	18	3,35	25,5	97,72	6,91	0,00
5	21	3,33	29,0	125,82	7,23	0,35
6	24	3,33	31,5	107,21	29,79	2,33
7	30	3,27	32,0	93,06	51,45	4,18
8	36	3,17	32,5	81,90	51,75	4,26
9	42	3,25	33,5	41,51	52,28	4,50
10	48	3,31	36,5	22,34	66,26	5,39
11	54	3,32	33,5	9,12	75,08	6,03
12	60	3,36	33,0	4,65	76,52	6,19
13	72	3,40	31,0	3,30	79,42	6,31

Tabela A.46 - Dados do Experimento V-2 - Sem Casca e Levedura selvagem

Amostra	Tempo (h)	pH	Temp (°C)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,42	21,5	152,62	0,22	0,00
2	10	3,40	23,0	136,80	0,36	0,36
3	14	3,34	23,5	129,36	0,31	0,22
4	18	3,33	25,0	125,63	4,36	0,27
5	21	3,32	29,0	140,71	7,27	0,50
6	24	3,30	31,0	114,65	9,68	0,59
7	30	3,27	31,0	79,66	38,55	2,78
8	36	3,20	33,0	54,35	52,45	3,89
9	42	3,25	34,5	13,03	64,38	4,40
10	48	3,30	37,0	4,84	68,91	4,83
11	54	3,36	33,5	3,35	69,56	5,05
12	60	3,39	31,5	2,72	71,55	5,11
13	72	3,42	30,5	2,50	73,10	5,17

Tabela A.47 - Dados do Experimento V-3 - Com Casca e Levedura Seleccionada

Amostra	Tempo (h)	pH	Temp (°C)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,32	24,0	161,93	4,64	0,27
2	10	3,31	25,0	158,21	4,38	0,28
3	14	3,30	25,0	147,04	6,16	0,39
4	18	3,29	25,0	144,25	10,87	0,71
5	21	3,28	28,5	139,22	13,71	0,90
6	24	3,25	30,0	121,35	10,60	0,74
7	30	3,17	32,5	100,51	27,17	1,99
8	36	3,17	35,5	81,15	44,16	3,43
9	42	3,23	31,5	59,37	52,37	3,99
10	48	3,26	30,5	28,10	64,73	4,41
11	54	3,26	30,5	19,73	65,97	4,74
12	60	3,29	30,0	11,17	68,96	4,99
13	67	3,33	30,0	3,07	71,11	5,16
14	72	3,34	30,0	2,20	77,2	5,97

Tabela A.48 - Dados do Experimento V-4 - Sem Casca e Levedura Seleccionada

Amostra	Tempo (h)	pH	Temp (°C)	A.R.T (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
1	0	3,32	24,5	167,51	2,11	0,00
2	10	3,30	24,5	165,65	2,03	0,00
3	14	3,31	24,5	166,58	1,64	0,00
4	18	3,33	25,0	161,93	1,94	0,00
5	21	3,37	25,5	160,07	1,90	0,00
6	42	3,35	26,0	157,28	4,80	0,39
7	45	3,32	27,0	156,35	7,66	0,62
8	48	3,24	29,5	150,76	15,57	1,24
9	51	3,21	29,5	143,69	20,20	1,82
10	54	3,19	30,0	107,21	26,31	2,29
11	57	3,18	30,5	65,89	35,95	2,47
12	60	3,19	31,5	50,25	43,50	3,00
13	67	3,26	32,5	37,41	53,20	3,99
14	72	3,28	32,5	13,96	62,86	4,16

APÊNDICE B

Programa na linguagem Fortran utilizado para otimizar as multi-respostas do experimento com casca e levedura selecionada.

```

PROGRAM MultiRespostacomCasca
  IMPLICIT NONE
  INTEGER J, K
  REAL T, pH, TotimAVPRODEt, pHotimAVPRODEt, TotimPRODEtCG, pHotimPRODEtCG,
  TotimAVCG, pHotimAVCG, TotimAVPRODEtCG, pHotimAVPRODEtCG
  REAL AV, PRODEt, CG, AVmax, PRODEtmax, CGmax, AVmin, PRODEtmin, CGmin, AVdej,
  PRODEtdej, CGdej
  REAL ALPHA, BETA, dAV, dPRODEt, dCG, DAVPRODEt, DAVPRODEtmax, DAVCG, DAVCGmax,
  DPRODEtCG, DPRODEtCGmax, DAVPRODEtCG, DAVPRODEtCGmax
  REAL AVotimAVPRODEt, PRODEtotimAVPRODEt, CGotimAVPRODEt, AVotimAVCG,
  PRODEtotimAVCG, CGotimAVCG, AVotimPRODEtCG, PRODEtotimPRODEtCG, CGotimPRODEtCG
  REAL AVotimAVPRODEtCG, PRODEtotimAVPRODEtCG, CGotimAVPRODEtCG

  ALPHA = 1.0
  BETA = 1.0
  T = -1.42
  pH = -1.42
  AVmin = 0.0
  AVmax = 1.2
  AVdej = 0.1
  PRODEtmin = 0.0
  PRODEtmax = 2.0
  PRODEtdej = 1.8
  CGmin = 0.0
  CGmax = 10.0
  CGdej = 9.6

  DO J = 0, 283
    T = T + 0.01
    DO K = 0, 283
      pH = pH + 0.01

  AV = 0.29 - 0.10*pH + 0.07*pH**2 + 0.09*T + 0.07*T**2.0 - 0.02*pH*T
  IF(AV < AVdej .AND. AV >= AVmin)THEN
    dAV = ((AVmin - AV) / (AVmin - AVdej))**(ALPHA)
  ELSE IF(AV <= AVmax .AND. AV >= AVdej)THEN
    dAV = ((AV - AVmax) / (AVdej - AVmax))**(BETA)
  ELSE
    dAV = 0.0
  END IF

  PRODEt = 1.18 + 0.22*pH - 0.25*pH**2.0 + 0.27*T + 0.23*T**2.0 + 0.06*pH*T
  IF(PRODEt > PRODEtdej .AND. PRODEt <= PRODEtmax)THEN
    dPRODEt = ((PRODEtmax - PRODEt) / (PRODEtmax - PRODEtdej))**(ALPHA)
  ELSE IF(PRODEt >= PRODEtmin .AND. PRODEt <= PRODEtdej)THEN
    dPRODEt = ((PRODEt - PRODEtmin) / (PRODEtdej - PRODEtmin))**(BETA)
  ELSE
    dPRODEt = 0.0
  END IF

```

```

CG = 6.75 + 0.91*pH - 1.19*pH**2.0 + 1.16*T + 1.04*T**2.0 - 0.05*pH*T
IF(CG > CGdej .AND. CG <= CGmax)THEN
  dCG = ((CGmax - CG) / (CGmax - CGdej))**(ALPHA)
ELSE IF(CG >= CGmin .AND. CG <= CGdej)THEN
  dCG = ((CG - CGmin) / (CGdej - CGmin))**(BETA)
ELSE
  dCG = 0.0
END IF

IF(dAV /= 0.0 .AND. dPRODEt /= 0.0 .AND. dCG /= 0.0)THEN
  DAVPRODEt = (dAV * dPRODEt)**(1.0 / 2.0)

  IF(DAVPRODEt > DAVPRODEtmax)THEN
    DAVPRODEtmax = DAVPRODEt

  TotimAVPRODEt = T
  pHotimAVPRODEt = pH
  AVotimAVPRODEt = AV
  PRODEtotimAVPRODEt = PRODEt
  CGotimAVPRODEt = CG
END IF

DAVCG = (dAV * dCG)**(1.0 / 2.0)
IF(DAVCG > DAVCGmax)THEN
  DAVCGmax = DAVCG

  TotimAVCG = T
  pHotimAVCG = pH
  AVotimAVCG = AV
  PRODEtotimAVCG = PRODEt
  CGotimAVCG = CG
END IF

DPRODEtCG = (dPRODEt * dCG)**(1.0 / 2.0)
IF(DPRODEtCG > DPRODEtCGmax)THEN
  DPRODEtCGmax = DPRODEtCG

  TotimPRODEtCG = T
  pHotimPRODEtCG = pH
  AVotimPRODEtCG = AV
  PRODEtotimPRODEtCG = PRODEt
  CGotimPRODEtCG = CG
END IF

DAVPRODEtCG = (dAV * dCG * dPRODEt)**(1.0 / 3.0)
IF(DAVPRODEtCG > DAVPRODEtCGmax)THEN
  DAVPRODEtCGmax = DAVPRODEtCG

  TotimAVPRODEtCG = T
  pHotimAVPRODEtCG = pH
  AVotimAVPRODEtCG = AV
  PRODEtotimAVPRODEtCG = PRODEt
  CGotimAVPRODEtCG = CG
END IF
END IF
END DO
pH = - 1.42
END DO

```

```

OPEN ( 2, FILE = 'Results.txt', STATUS = 'UNKNOWN' )
WRITE (2, '(A45)') 'Otimização'
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Concentração Acidez Volátil e Produtividade em Etanol com Casca'
WRITE (2, *) 'Variáveis de Processo:'
WRITE (2, '(A12, TR3, F4.1, TR1, A1)') 'Temperatura:', TotimAVPRODEt, 'C'
WRITE (2, '(A3, TR3, F4.2)') 'pH:', pHotimAVPRODEt
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Variáveis Resposta'
WRITE (2, '(A32, TR3, F6.3, TR1, A3)') 'Acidez Volátil Mínima com Casca:', AVotimAVPRODEt, 'g/L'
WRITE (2, '(A40, TR3, F6.2, TR1, A3)') 'Produtividade em Etanol Máxima com
Casca:', PRODEtotimAVPRODEt, 'g/L'
WRITE (2, '(A42, TR3, F5.2, TR1, A3)') 'Concentração de Glicerol Máxima com
Casca:', CGotimAVPRODEt, 'g/L'
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Concentrações Acidez Volátil e Glicerol com Casca'
WRITE (2, *) 'Variáveis de Processo:'
WRITE (2, '(A12, TR3, F4.1, TR1, A1)') 'Temperatura:', TotimAVCG, 'C'
WRITE (2, '(A3, TR3, F4.2)') 'pH:', pHotimAVCG
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Variáveis Resposta'
WRITE (2, '(A32, TR3, F6.3, TR1, A3)') 'Acidez Volátil Mínima com Casca:', AVotimAVCG, 'g/L'
WRITE (2, '(A40, TR3, F6.2, TR1, A3)') 'Produtividade em Etanol Máxima com
Casca:', PRODEtotimAVCG, 'g/L'
WRITE (2, '(A42, TR3, F5.2, TR1, A3)') 'Concentração de Glicerol Máxima com Casca:', CGotimAVCG,
'g/L'
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Produtividade em Etanol Concentração de Glicerol com Casca'
WRITE (2, *) 'Variáveis de Processo:'
WRITE (2, '(A12, TR3, F4.1, TR1, A1)') 'Temperatura:', TotimPRODEtCG, 'C'
WRITE (2, '(A3, TR3, F4.2)') 'pH:', pHotimPRODEtCG
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Variáveis Resposta'
WRITE (2, '(A32, TR3, F6.3, TR1, A3)') 'Acidez Volátil Mínima com Casca:', AVotimPRODEtCG, 'g/L'
WRITE (2, '(A40, TR3, F6.2, TR1, A3)') 'Produtividade em Etanol Máxima com
Casca:', PRODEtotimPRODEtCG, 'g/L'
WRITE (2, '(A42, TR3, F5.2, TR1, A3)') 'Concentração de Glicerol Máxima com
Casca:', CGotimPRODEtCG, 'g/L'
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Concentrações Acidez Volátil e Glicerol e Produtividade em Etanol com Casca'
WRITE (2, *) 'Variáveis de Processo:'
WRITE (2, '(A12, TR3, F4.1, TR1, A1)') 'Temperatura:', TotimAVPRODEtCG, 'C'
WRITE (2, '(A3, TR3, F4.2)') 'pH:', pHotimAVPRODEtCG
WRITE (2, *) ''
WRITE (2, *) 'Variáveis Resposta'
WRITE (2, '(A32, TR3, F6.3, TR1, A3)') 'Acidez Volátil Mínima com Casca:', AVotimAVPRODEtCG, 'g/L'
WRITE (2, '(A40, TR3, F6.2, TR1, A3)') 'Produtividade em Etanol Máxima com
Casca:', PRODEtotimAVPRODEtCG, 'g/L'
WRITE (2, '(A42, TR3, F5.2, TR1, A3)') 'Concentração de Glicerol Máxima com
Casca:', CGotimAVPRODEtCG, 'g/L'

END PROGRAM MultiRespostacomCasca

```

Resposta obtida por esse programa

Otimização

Concentração Acidez Volátil e Produtividade em Etanol com Casca

Variáveis de Processo:

Temperatura: 1.1 C

pH: .71

Variáveis Resposta

Acidez Volátil Mínima com Casca: .413 g/L

Produtividade em Etanol Máxima com Casca 1.80 g/L

Concentração de Glicerol Máxima com Casca: 9.16 g/L

Concentrações Acidez Volátil e Glicerol com Casca

Variáveis de Processo:

Temperatura: 1.2 C

pH: .63

Variáveis Resposta

Acidez Volátil Mínima com Casca: .441 g/L

Produtividade em Etanol Máxima com Casca 1.89 g/L

Concentração de Glicerol Máxima com Casca: 9.59 g/L

Produtividade em Etanol Concentração de Glicerol com Casca

Variáveis de Processo:

Temperatura: 1.3 C

pH: -.26

Variáveis Resposta

Acidez Volátil Mínima com Casca: .555 g/L

Produtividade em Etanol Máxima com Casca 1.80 g/L

Concentração de Glicerol Máxima com Casca: 9.60 g/L

Concentrações Acidez Volátil e Glicerol e Produtividade em Etanol com Casca

Variáveis de Processo:

Temperatura: 1.0 C

pH: .57

Variáveis Resposta

Acidez Volátil Mínima com Casca: .415 g/L

Produtividade em Etanol Máxima com Casca 1.80 g/L

Concentração de Glicerol Máxima com Casca: 9.22 g/L