



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE
VINHO DE ABACAXI (*Ananas comosus* L)

Priscila Molinares dos Santos

Orientador: Edson Romano Nucci

Ouro Branco

Dezembro/2014

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE VINHO DE ABACAXI (*Ananas comosus* L)

Priscila Molinares dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João Del Rei.

Orientador: Edson Romano Nucci

Ouro Branco

Dezembro/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE
VINHO DE ABACAXI (*Ananas comosus* L)**

Priscila Molinares dos Santos

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Edson Romano Nucci – **Orientador**

José Carlos de Magalhães - **Examinador 1**

Enio Nazaré de Oliveira Junior - **Examinador 2**

Ouro Branco, 03/ 12 / 2014

Resumo

As bebidas fermentadas de fruta são produtos promissores para aqueles consumidores que estão sempre em busca de novidades. Além disso, são uma alternativa para a redução das perdas pós-colheita de frutos perecíveis. Este trabalho tem por objetivo aplicar a técnica do planejamento experimental fatorial para otimizar a produção do vinho de abacaxi utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi realizado um planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central, resultando num total de 7 experimentos, avaliando os efeitos das concentrações de levedura (0,3; 0,6 e 0,9 g.L⁻¹) e teores de sólidos solúveis (15, 19 e 22 °Brix) na variável dependente teor alcoólico. De acordo com os resultados, o ponto ótimo corresponde a 22 °Brix com concentração de levedura de 0,9 g.L⁻¹, obtendo um teor alcoólico de 6°GL (%v/v) enquadrando-se dentro das especificações a cerca de fermentados de fruta. No entanto, pode-se dizer que há uma faixa na qual os valores são otimizados: entre 0,6 e 0,9 g.L⁻¹ de levedura e 20 a 22 °Brix.

Palavras-chave: abacaxi, vinho, planejamento experimental.

Sumário

1. Introdução	6
2. Objetivos	7
3. Revisão bibliográfica	8
3.1 Fermentação alcoólica	8
3.2 Produção de fermentado de fruta	9
3.2.1 Preparo do mosto	10
3.2.2 Sulfitação e chaptalização	10
3.2.3 Inoculação e fermentação	11
3.2.4 Trásfega e filtração	11
3.2.5 Envase e armazenamento	12
3.2.6 Análises físico-químicas	12
3.3 Planejamento experimental	13
4. Material e métodos	16
4.1 Preparo do biorreator	16
4.2 Preparo do mosto	17
4.3 Inoculação	18
4.4 Fermentação e filtração	18
4.5 Análises	18
4.6 Aplicação do planejamento experimental	19
5. Resultados	20
6. Discussão	26
7. Conclusão	28
8. Referências bibliográficas	29

1. Introdução

Originário do Brasil, o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) é uma planta de clima tropical, monocotiledônea, herbácea e perene da família *Bromeliaceae*. O fruto é utilizado tanto para o consumo in natura quanto na industrialização, em diferentes formas: pedaços em calda, suco, pedaços cristalizados, geleias, licor, vinho, vinagre e aguardente. Como subproduto desse processo industrial pode-se obter ainda: álcool, ácidos cítrico, málico e ascórbico; rações para animais e a bromelina. A bromelina é uma substância de alto valor medicinal, trata-se de uma enzima muito utilizada como digestivo e anti-inflamatório. Na culinária, o suco de abacaxi é utilizado para o amaciamento de carnes. Além disso, os frutos do abacaxi são ótimas fontes de cálcio, vitaminas A, B e C (NASCENTE et al 2014).

O cultivo de abacaxi concentra-se em seis países produtores que respondem por mais de 59% da produção mundial. O principal produtor mundial de abacaxi é a Tailândia, seguido pelo Brasil, Filipinas, China, Índia e Costa Rica (AGRIANUAL, 2008).

O agronegócio brasileiro representa um dos mais importantes segmentos para a economia do país com maior produção mundial de frutas. No entanto, a produção de alimentos hortifrutícolas implica em consideráveis perdas cumulativas durante toda a cadeia de comercialização, iniciando na colheita e estendendo-se até a mesa do consumidor (VIEIRA, 2012). Uma das alternativas para minimizar essas perdas é a produção de bebida alcoólica a partir de frutas.

O abacaxi, em sua composição química, é constituído em média por 89,9% de água, 0,3% de proteínas, 0,5% de lipídeos, 5,8% de glicídios, 3,2% de celulose e 0,3% de sais (BORGES et al 2004). Sendo assim, o elevado teor de açúcar do abacaxi consiste em uma característica favorável para aplicação em processos biotecnológicos, como por exemplo, na fermentação alcoólica.

A fermentação é um dos processos mais antigos e usados pelos egípcios na fabricação de bebidas alcoólicas a partir de frutas e cereais existentes há mais de 4.000 anos. A fermentação alcoólica é feita por leveduras que hidrolisam basicamente os açúcares (glicose, frutose, sacarose

e outros) transformando-os em álcool etílico e gás carbônico, além de outros produtos secundários, como ácidos orgânicos (PARENTE et al 2014).

Em processos industriais, é comum a existência de muitos fatores ou variáveis que afetam a qualidade global do produto final. Neste contexto, a Metodologia de Superfícies de Resposta vem sendo estudada em conjunto com técnicas de otimização. Basicamente, consiste na modelagem, que é feita ajustando-se modelos polinomiais a resultados experimentais, obtidos por meio de planejamento experimental (SARAMAGO et al 2008). As técnicas estatísticas, tais como o planejamento experimental, são utilizadas de modo a concluir algo em relação à dependência das variáveis analisadas. Além disso, é possível determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultado a redução do tempo operacional, redução do custo e melhoria no rendimento (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo aplicar o estudo do planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção do vinho de abacaxi (*Ananas comosus* L) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é conduzida pelas leveduras que são fungos unicelulares, não filamentosos, de formatos ovais ou esféricos. A levedura mais estudada é a *Saccharomyces cerevisiae*. Sua célula consiste em parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, vacúolos e mitocôndria. Possuem metabolismo aeróbio facultativo, ou seja, tem habilidade de se ajustar tanto em condições de anaerobiose ou aerobiose (ALEXANDRINO, 2012).

A obtenção do fermentado de fruta se dá pela fermentação alcoólica, etapa mais importante do processo que engloba um conjunto de reações enzimáticas controladas. Na maioria das vezes, utiliza-se a *Saccharomyces* sp. 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. Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra (SCHMIDELL et al 2001).

A transformação do açúcar em etanol e CO₂, processo denominado glicólise, envolve 12 reações em sequência ordenada, onde cada uma delas é catalisada por uma enzima específica. Essas enzimas, denominadas glicolíticas, se encontram no citoplasma celular, região da célula em que a fermentação alcoólica se processa e pode sofrer ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (LIMA et al 2001).

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol (PACHECO, 2010). A temperatura de fermentação é um parâmetro extremamente importante, pois permite obter alto rendimento em álcool, não somente para que a fermentação seja completa, mas também por

minimizar a perda por evaporação. Ela afeta a velocidade da fermentação e a quantidade de compostos secundários (OLIVEIRA et al 2011).

Todos os fatores citados são essenciais para a elaboração do fermentado de fruta, assim é feito um ajuste no mosto para que a fermentação se inicie. A quantidade de mosto a ser preparada irá depender da quantidade desejada do produto final (fermentado). Modificando-se o processo fermentativo e variando-se os substratos, é possível notar que o rendimento pode mudar, aumentando ou diminuindo, de acordo com o ajuste de cada variável (ASQUIERI et al 2009).

3.2 Produção de fermentado de fruta

A legislação vigente estabelece que vinho de frutas ou fermentado de frutas é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura (BRASIL, 1997). Teoricamente, qualquer fruto ou vegetal comestível, que contenha umidade suficiente, açúcar e outros nutrientes para as leveduras, pode servir como matéria-prima para a produção de bebidas fermentadas (VIEIRA, 2012).

De acordo com o Decreto n. 2.314/1997, o “fermentado de fruta pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias previstas em ato administrativo complementar, para cada tipo de fruta” (BRASIL, 1997).

O processo de obtenção de fermentados a partir de frutas é muito semelhante ao processo de produção de vinho, com algumas adaptações que variam com o tipo de fruta utilizada (VIEIRA, 2012). Admite-se, tradicionalmente que o nome vinho seja reservado só para a bebida proveniente da uva. Para bebidas produzidas por fermentação alcoólica que não seja a uva, deve-se indicar o nome da fruta (CORAZZA, 2001). Portanto, no caso deste experimento, pode-se referir tanto como vinho de abacaxi ou fermentado de abacaxi.

Para a produção de fermentado, a qualidade interna do fruto é de grande importância e está relacionada com a coloração da polpa, ausência de injúrias e com as características de sabor, aroma, textura e doçura, as quais são importantes na sua aceitação final. A qualidade está diretamente relacionada

às condições climáticas e de aspectos de maturação do fruto (MIGUEL et al 2008).

3.2.1 Preparo do mosto

Dá-se o nome de mosto ao caldo ou suco obtido das frutas, depois de espremidas, para a elaboração dos diversos tipos de vinhos (MORETTO et al 1988).

O preparo do mosto é uma operação de importância fundamental. Quando mal preparado, leva consigo substâncias indesejáveis e outras transformações e decomposições que afetam a qualidade do vinho. As frutas, quando utilizadas completamente amadurecidas, são mais ricas em açúcar, economizando parte daquele que vai ser acrescentado para a correção do mosto para o grau alcoólico desejado e, sendo menos ácida, favorecem a qualidade do vinho (MORETTO et al 1988).

Em geral, pode-se dizer que o preparo do mosto constitui a seleção do fruto, extração da polpa, sulfitação e correções de açúcar e acidez; etapas realizadas antes da inoculação da levedura.

3.2.2 Sulfitação e chaptalização

Para assegurar a assepsia, ou seja, reduzir a carga microbiana deteriorante, sem afetar a atividade fermentativa das leveduras e prevenir oxidações indesejáveis, é recomendável a adição de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de bissulfito de sódio (TAVARES, 2009).

A chaptalização é a prática difundida por Jean Antoine Chaptal (1756-1832) que consiste na correção da deficiência de açúcar no mosto com sacarose, antes ou durante a fermentação, favorecendo o equilíbrio do vinho através da elevação do grau alcoólico (VIEIRA, 2012). Geralmente, a chaptalização é feita quando a fruta não tem quantidades suficientes de açúcares ou quando se deseja uma bebida com graduação alcoólica elevada.

3.2.3 Inoculação e fermentação

Os fermentos de interesse industrial pertencem ao gênero *Saccharomyces cerevisiae*. Trata-se do fermento mais abundante e o que se encontra em maior quantidade. Os fermentos selecionados constituem-se primordialmente em representantes dessa espécie (MORETTO et al 1988).

Capacidade de transformar rapidamente açúcar em etanol, alta tolerância ao produto formado, tolerância a grandes variações de temperatura e atividade celular em ambiente ácido consagram a *Saccharomyces cerevisiae* como a levedura mais indicada para a fermentação alcoólica (CERQUEIRA, 2013). Além disso, é um organismo considerado não patogênico, e devido a seu longo histórico de aplicação na produção de alimentos e bebidas alcoólicas, foi classificada como um organismo GRAS do inglês Generally Recognized As Safe (geralmente considerados como seguros) (ALEXANDRINO, 2012).

Parente et al (2014) consideram o processo de fermentação alcoólica uma das etapas mais importantes para elaboração de vinhos e bebidas fermentadas. Nesse processo, podem-se distinguir três fases: uma preliminar que é de adaptação da cultura ao meio (fase lag), a fase de crescimento exponencial (fase log) e, a fase complementar que é o fim da fermentação (CORAZZA, 2001).

Considera-se o término da fermentação quando o teor de açúcar acusa o menor grau possível, geralmente 5 °Brix (SILVA et al 2010).

3.2.4 Tráfega e filtração

A etapa de tráfega consiste em passar o mosto ou o vinho de um depósito a outro para eliminar qualquer sedimento que se deposite no fundo do recipiente e que, em contato com o vinho (ou a bebida fermentada), pode transferir e provocar odores e sabores estranhos. Também com a tráfega se consegue que o vinho (ou a bebida fermentada) oxigene se, adquirindo oxigênio necessário para sua evolução posterior (VIEIRA, 2012).

Os processos mais naturais de clarificação aguardam a sedimentação das partículas por um longo tempo. Se ainda assim a turvação persistir, devido

a partículas menores que não se sedimentam, deve-se eliminá-las pela filtração ou por meio de clarificantes (TAVARES, 2009).

A filtração mais rudimentar consiste na passagem do vinho por coadores de flanela, feltro ou panos semelhantes, sendo recomendada para pequenas quantidades e como filtração doméstica. Em contrapartida, a filtração industrial utiliza-se de filtros prensa, forçando o vinho sob pressão a atravessar consecutivamente diversas paredes de lona especial ou a passar por velas de porcelana (MORETTO, 1988).

3.2.5 Envase e armazenamento

O envase consiste em colocar no recipiente certa quantidade de vinho, deixando um espaço vazio, necessário para eventual dilatação e para aplicar o sistema de vedação. Este sistema, geralmente feito com a rolha de cortiça, tem como principal função proteger o vinho das contaminações microbianas e das oxidações (RIZZON et al 2006).

Após o processo de acondicionamento do vinho nas garrafas, elas são transportadas para o setor de envelhecimento e empilhadas horizontalmente, para manter a rolha úmida. Nesse local, o vinho passa por uma série de transformações físico-químicas. O seu aroma torna-se mais fino e agradável e sua cor sofre modificações devido às alterações das antocianinas, responsáveis pela coloração vermelha do vinho tinto jovem. O setor de envelhecimento deve ser um local limpo, bem higienizado, ventilado, com pouca incidência de luz, umidade moderada e temperatura baixa e constante (RIZZON et al 2006).

3.2.6 Análises físico- químicas

Segundo Moretto et al (1988), as análises físico-químicas são de grande importância e por isso são realizadas durante e depois do processo de fermentação para garantir a qualidade do produto final. Diariamente, verifica-se a quantidade de açúcar existente, o qual decresce rapidamente como

consequência de sua utilização. O controle do açúcar é realizado com auxílio de um refratômetro, que expressa em °Brix o teor de sólidos solúveis (Figura 1A).

Quando o teor de açúcar acusa o menor grau possível, geralmente 5°Brix, o fermentado é submetido à filtração e medido o teor alcoólico, por meio de um alcoômetro (Figura 1B). Essa medição é feita em grau Gay Lussac (%v/v), que indica o volume de álcool contido em 100 volumes de uma mistura feita exclusivamente de álcool e água (MORETTO et al 1988).

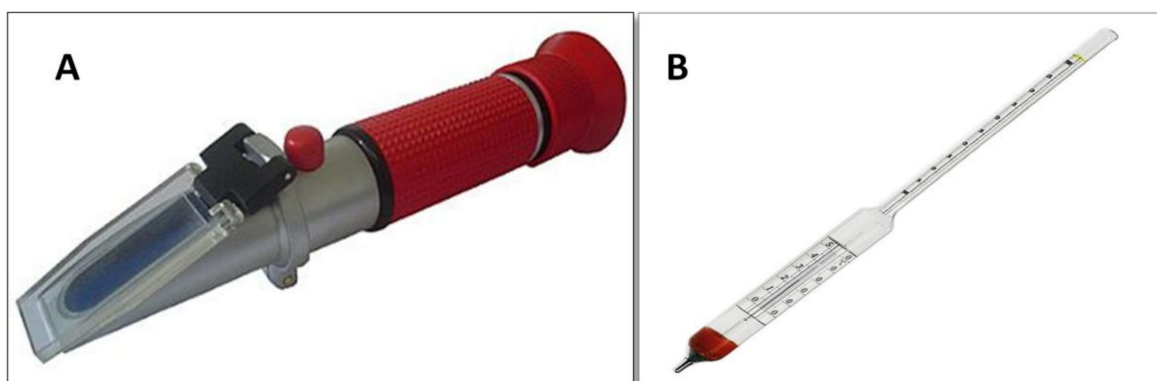


Figura 1. A) Refratômetro e B) Alcoômetro. FONTE: Google imagens, 2014.

3.3 Planejamento Experimental

O planejamento experimental pode ser considerado como um processo pelo qual certos fatores são selecionados e variados de maneira controlada para obter os seus efeitos sobre uma resposta de interesse, muitas vezes, seguido pela análise dos resultados experimentais (WANG e WAN, 2008).

O planejamento fatorial completo é uma técnica bastante utilizada quando se têm duas ou mais variáveis independentes (fatores). Ele permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim uma análise de uma variável sujeita a todas as combinações das demais (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

O usual é realizar um planejamento com dois níveis, no máximo três. A representação de um planejamento fatorial em dois níveis é 2^k , onde 2 significa

o número de níveis e k o número de fatores. No caso de três níveis, tem-se 3^k (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Um modelo polinomial adequado pode ser usado para descrever os efeitos dos fatores estudados sobre a resposta:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i < j}^n \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^n \beta_{ij} X_j^2 \quad (1)$$

onde Y é a resposta prevista.

Neste experimento, 2 variáveis são envolvidas e, portanto, n tem o valor 2:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_{12} X_1 X_2 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 \quad (2)$$

A curva de nível (em 2D) e curva da superfície de resposta (em 3D) são geralmente a representação gráfica dessa equação de regressão. Curvas de nível circulares das superfícies de resposta sugerem que a interação entre as variáveis correspondentes é insignificante. Entretanto, curvas de nível de natureza elíptica ou sela indicam a importância das interações entre as variáveis correspondentes (WANG e LIU, 2008).

A análise da variância, também denominada ANOVA, é utilizada para avaliar a adequação do modelo ajustado. O valor de R^2 fornece uma medida de quanto a variabilidade dos valores das respostas observadas poderia ser explicada por fatores experimentais e as suas interações. Um bom modelo (valores acima de 0,9 são considerados muito bons) explica a maior parte da variação na resposta. Quanto mais perto o valor de R^2 é de 1,00, mais forte é o modelo e melhor a resposta prevista (BURKERT et al 2004).

O planejamento experimental é de grande importância em processos fermentativos, pois o processo é influenciado por diversos fatores tais como substrato, pH, temperatura, condições operacionais etc., assim, um planejamento experimental apropriado pode ser utilizado para estudar os efeitos de vários fatores no processo para torná-lo mais facilmente compreendido e ainda otimizado para melhorar o seu desempenho (WANG e WAN, 2008).

Um experimento laboratorial é um procedimento no qual alterações propositalmente são feitas nas variáveis de entrada de um processo, de modo a

avaliar as possíveis alterações sofridas pela variável resposta. O planejamento de um experimento tem por objetivo reduzir o tempo de execução, melhoria no rendimento e redução de custos (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

4. Material e Métodos

Inicialmente foram estudadas algumas variáveis a serem analisadas pelo planejamento experimental. Desse modo, decidiu-se que seriam estudados dois níveis (mínimo e máximo) e duas variáveis independentes: a concentração de leveduras e o °Brix. A variável de resposta (ou variável dependente) seria o teor alcoólico. Dessa forma, o planejamento seria um fatorial 2^2 com três pontos centrais, totalizando sete experimentos. Em sequência, os materiais e reagentes necessários foram providenciados.

4.1 Preparo do biorreator

O biorreator desenvolvido para a fermentação consistiu de um recipiente de vidro com tampa e capacidade para 3 litros (Figura 2). Em cada tampa foi feito um orifício para a passagem de uma mangueira com diâmetro maior, utilizada para a coleta diária de amostra por meio de uma seringa plástica e, uma mangueira com diâmetro menor para a saída do gás carbônico. Ambas as mangueiras foram coladas na tampa. A tampa foi vedada com fita adesiva para evitar a saída de gás carbônico e minimizar possíveis contaminações.



Figura 2. Recipiente utilizado como biorreator.

Os sete biorreatores utilizados para a fermentação foram lavados com água e sabão e, em seguida, com álcool 70% (v/v) e colocados no fluxo com luz UV durante 30 minutos. Cada biorreator foi identificado pela numeração de 1 a 7, sendo os biorreatores 5, 6 e 7 os pontos centrais do planejamento experimental.

4.2 Preparo do mosto

Os abacaxis mais maduros e sem danos externos foram selecionados e adquiridos no mercado local. A casca e a coroa foram descartadas, e o restante foi lavado com água, picado em cubos (Figura 3) e triturado em um liquidificador para facilitar a ação da levedura.

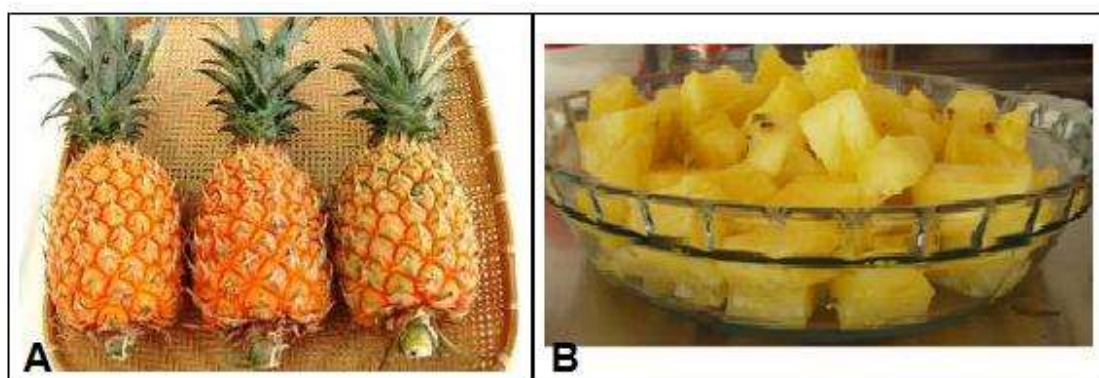


Figura 3. 3A) Abacaxi selecionado e 3B) picado.

Após a trituração e com auxílio de uma balança, foi pesada uma massa de aproximadamente 500 g para cada biorreator. Foi adicionado 0,1g de bissulfito de potássio em cada biorreator para evitar possíveis oxidações e reduzir a carga microbiana deteriorante. Este procedimento foi realizado dentro do fluxo laminar. Em seguida, para o ajuste do °Brix inicial, estipulado pelo planejamento experimental, adicionou-se água e/ou açúcar. Os valores iniciais do °Brix, estabelecidos para o início da fermentação, foram 15°, 19° e 22°Brix.

4.3 Inoculação

Para dar início à fermentação, utilizou-se o fermento biológico adquirido no mercado local (Figura 4). Os valores estabelecidos para o planejamento experimental, baseados em experimentos anteriores, foram 0,3; 0,6 e 0,9 g de fermento para os níveis estudados. Estes valores representam os valores mínimo, médio e máximo respectivamente, do planejamento experimental.



Figura 4. Fermento biológico fresco.

4.4 Fermentação e filtração

A fermentação alcoólica foi mantida à temperatura ambiente ($\pm 17^{\circ}\text{C}$) durante sete dias, sendo o final do processo definido em função da estabilização da concentração residual de açúcares no mosto fermentado. Após a estabilização do grau Brix, os biorreatores foram transferidos para a geladeira a fim de permitir a decantação de sólidos presentes. Depois de 48 horas, realizou-se a trasfega e, em seguida, a filtração do vinho de abacaxi com auxílio de papel filtro. O teor alcoólico foi medido logo após a filtração.

4.5 Análises

Um pHmetro foi utilizado para verificar o pH do mosto antes da inoculação e depois da fermentação, sendo os valores obtidos de pH 3,71 e pH

3,50 respectivamente. Além disso, foram realizadas medições diárias do teor de sólidos solúveis (°Brix) com o auxílio de um refratômetro.

Após a filtração, o produto final foi colocado em uma proveta e com um alcoômetro, mediu-se o teor alcoólico alcançado.

4.6 Aplicação do planejamento Experimental

Considerando um planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais, obteve-se a matriz mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental

Teste	Concentração de levedura	°Brix
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Sabendo que (-1) corresponde ao nível mínimo, (0) ao médio e (1) ao máximo das variáveis independentes selecionadas, construiu-se a Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental utilizada para a produção de vinho de abacaxi

Biorreator	Valores codificados		Valores reais	
	X ₁	X ₂	Concentração de levedura (g.L ⁻¹)	°Brix
1	-1	-1	0,3	15
2	1	-1	0,9	15
3	-1	1	0,3	22
4	1	1	0,9	22
5	0	0	0,6	19
6	0	0	0,6	19
7	0	0	0,6	19

Ao final da fermentação, com a medição do teor alcoólico, foi possível inserir todos esses dados no software Statística 7.0 e analisar o resultado do planejamento experimental.

5. Resultados

Durante os sete dias de fermentação (Figura 5) foi possível observar a formação de bolhas devido ao gás carbônico, o odor característico de fermentação além da separação de fases. Um exemplo de tais características pode ser observado na Figura 6 onde ilustra um dos biorreatores utilizados durante a fermentação.



Figura 5. Biorreatores durante a fermentação.

Entre o terceiro e o quinto dia notou-se uma queda drástica do grau Brix em todos os biorreatores, sendo que a partir do sétimo dia o °Brix estabilizou e foi

possível realizar as etapas de filtração e medição do teor alcoólico. A Tabela 3 mostra os valores iniciais e finais do °Brix.



Figura 6. Biorreator de número 6, correspondente ao ponto central do planejamento experimental, mostrando no fundo uma fase líquida e a formação de espuma logo acima.

Tabela 3. Valores iniciais e finais do °Brix de cada biorreator após 12 dias

Biorreator	°Brix inicial	°Brix final
1	15	5,5
2	15	6
3	22	8
4	22	8
5	19	6,5
6	19	6,5
7	19	7

O decréscimo do teor de açúcar em função do tempo está ilustrado na Figura 7.

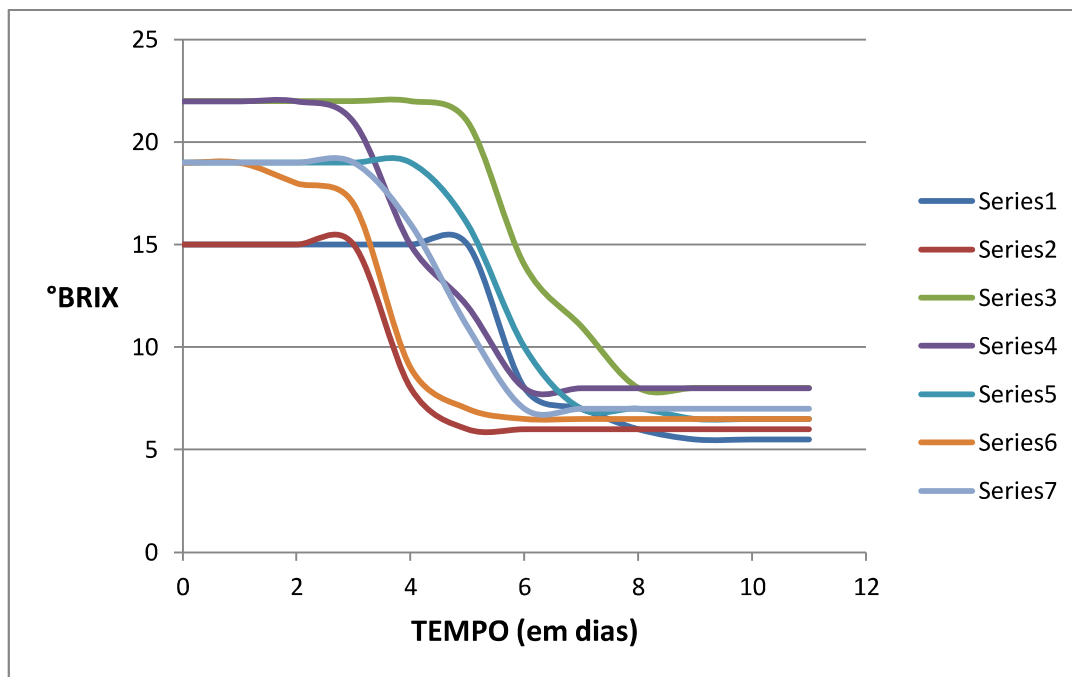


Figura 7. Variação do teor de sólidos solúveis (°Brix) em relação ao tempo (em dias).

Após os biorreatores terem sido mantidos na geladeira durante dois dias, deu-se início ao processo de filtração. Realizou-se a trasfega para separar o corpo de fundo do vinho de abacaxi e, com auxílio do papel filtro foi possível obter um vinho de abacaxi clarificado e dessa forma, medir o teor alcoólico. A Tabela 4 mostra a relação das variáveis independentes com o teor alcoólico (variável de resposta).

Tabela 4. Relação das variáveis independentes com a variável de resposta

Biorreator	Concentração de levedura (g.L ⁻¹)	°Brix	Teor alcoólico %(v/v)
1	0,3	15	4
2	0,9	15	4
3	0,3	22	6
4	0,9	22	5
5	0,6	19	5
6	0,6	19	6
7	0,6	19	6

Após o término do experimento, os dados da Tabela 4 foram inseridos no software Statistica 7.0 para dar início à análise do planejamento experimental (Figura 8).

Standard Run	Concentração de células (Cont.)	°Brix (Cont.)	Teor alcoólico
1	-1	-1	4,00
2	1	-1	4,00
3	-1	1	5,00
4	1	1	6,00
5 (C)	0	0	5,00
6 (C)	0	0	6,00
7 (C)	0	0	6,00

Figura 8. Matriz do planejamento experimental 2^2 com três pontos centrais e uma variável de resposta (teor alcoólico).

Dentre os parâmetros analisados pelo software, obteve-se a Tabela dos Efeitos (Figura 9), indicando quais variáveis são significativas. Entretanto, através dos resultados obtidos, pode-se observar que nenhuma das duas variáveis de estudo e nem a interação entre elas apresentaram ser estatisticamente significativas, mas que, como pesquisadora do processo, pode-se dizer que as mesmas influenciam na resposta desejada, ou seja, no teor alcoólico do fermentado.

Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	5,142857	0,316765	16,23555	0,000508	4,13477	6,150945	5,142857	0,316765	4,13477	6,150945
(1)Concentração de células	0,500000	0,838082	0,59660	0,592796	-2,16715	3,167150	0,250000	0,419041	-1,08358	1,583575
(2)°Brix	1,500000	0,838082	1,78980	0,171423	-1,16715	4,167150	0,750000	0,419041	-0,58358	2,083575
1 by 2	0,500000	0,838082	0,59660	0,592796	-2,16715	3,167150	0,250000	0,419041	-1,08358	1,583575

Figura 9. Tabela dos Efeitos de acordo com os dados inseridos no software Statística 7.0.

A Figura 10 representa a Tabela de Análise da Variância (ANOVA).

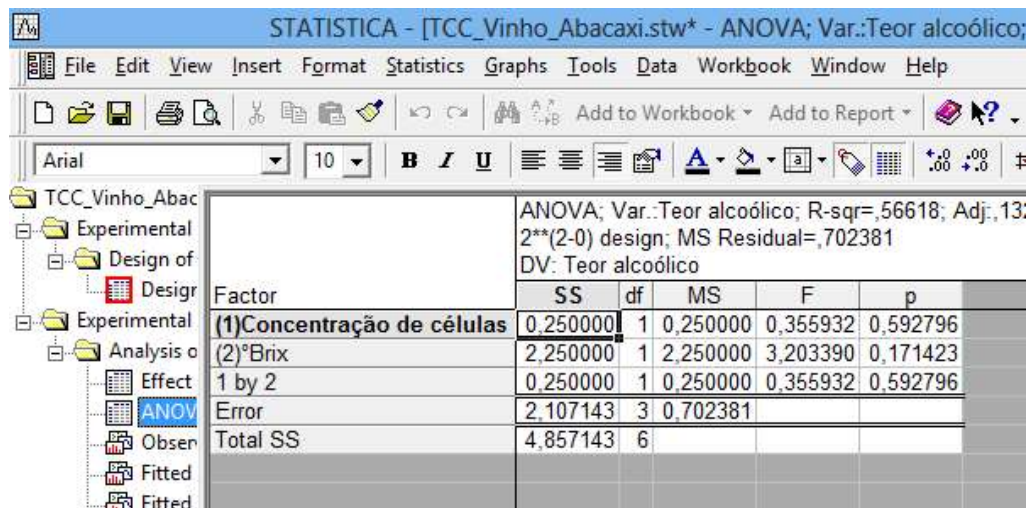


Figura 10. Tabela de Análise da Variância (ANOVA).

Finalmente, obteve-se a representação gráfica dos resultados em que foi possível identificar a região ótima da fermentação, como ilustrado nas Figuras 11 e 12.

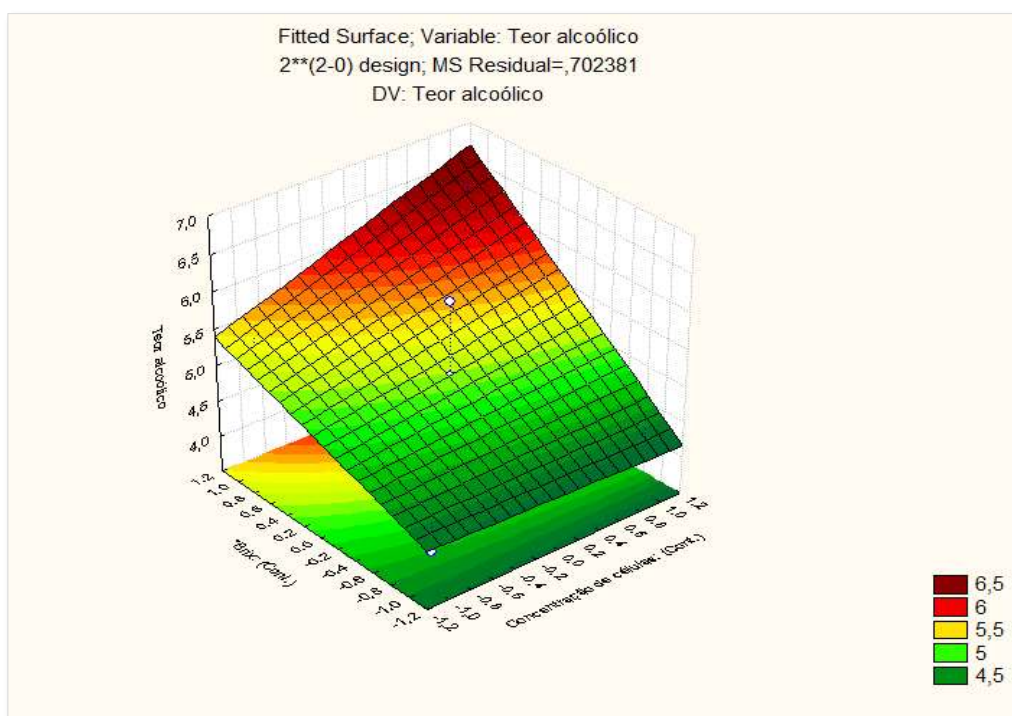


Figura 11. Superfície de resposta do planejamento experimental das variáveis °Brix, concentração de leveduras e teor alcoólico.

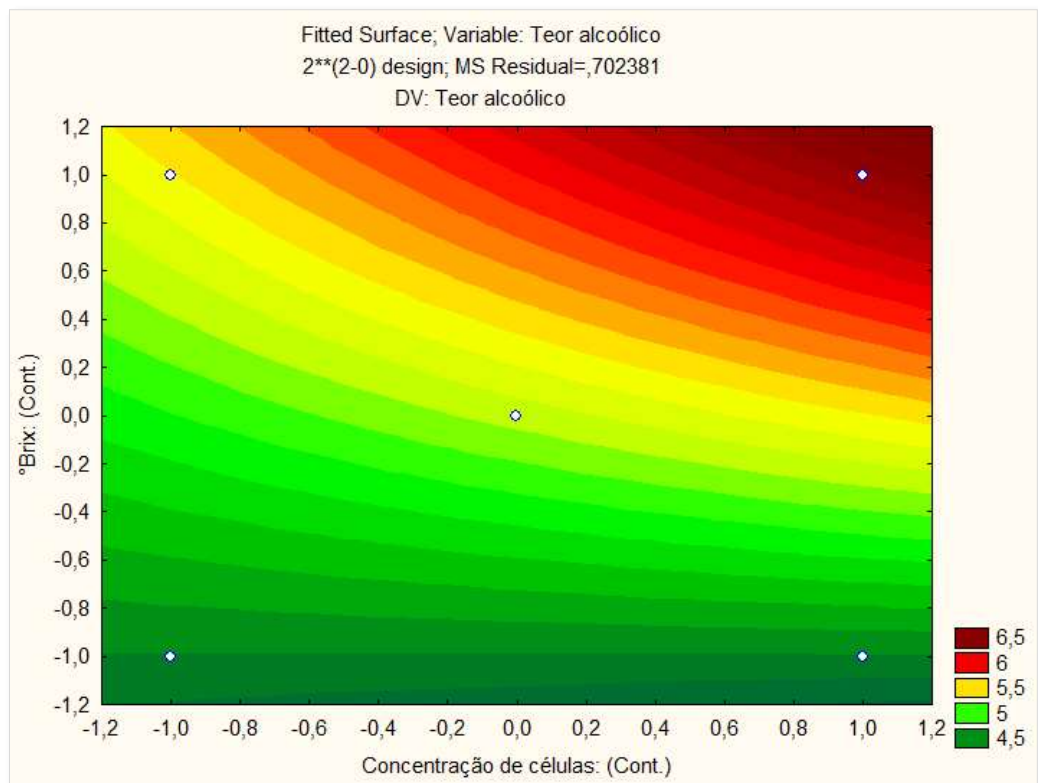


Figura 12. Curva de nível do planejamento experimental das variáveis °Brix, concentração de leveduras e teor alcoólico.

6. Discussão

Ao longo da fermentação, notou-se uma diferença entre os biorreatores. Alguns apresentaram a presença de bolhas e formação de espuma, diferenciando em duas fases, enquanto outros se mostraram mais homogêneos. Essa diferença pode ser explicada pelo acréscimo de água em alguns casos para o ajuste inicial do °Brix que, portanto caracterizou alguns mostos mais diluídos e homogêneos que outros.

Em todos os mostos foi necessário adicionar uma quantia considerável de açúcar, para atingir os valores estabelecidos pelo planejamento experimental, pois, os frutos selecionados para o experimento não se encontravam muito maduros, apresentando teor de sólidos solúveis abaixo de 15°Brix. Isso pode ser devido à época em que o experimento foi realizado (no inverno) e, portanto o abacaxi não se encontrava muito disponível nos mercados locais.

A adição tanto de água quanto de açúcar fez com que houvesse variação nos volumes de mosto que inicialmente eram de 500g. Por isso, ao longo da fermentação observou-se a diferença de fases discutida acima. E no final, obtiveram-se diferentes volumes de vinhos de abacaxi.

O pH inicial do mosto (pH 3,71) foi um pouco abaixo do pH ideal (pH 4,0) para a levedura o que pode ter comprometido o produto final.

Os dados encontrados na literatura relatam o término da fermentação quando o teor de sólidos solúveis atinge 5 °Brix. No entanto, de acordo com a Tabela 3, cada biorreator teve a fermentação paralisada em um °Brix diferente, porém a queda do °Brix ocorreu praticamente simultânea, no terceiro e quarto dias. O decréscimo do teor de açúcar (°Brix) no mosto deve-se ao consumo de açúcar pela levedura para a produção do etanol. Quando o substrato é consumido quase em sua totalidade pelas leveduras, o °Brix é estabilizado como foi observado na Figura 7 após o oitavo dia.

A temperatura é um parâmetro muito importante que deve ser controlado ao longo de um processo de fermentação. Devido à estrutura e condições dos laboratórios onde foram realizados os experimentos, não foi possível aquecer os biorreatores e otimizar a fermentação. Dessa forma, o processo ocorreu à

temperatura ambiente que no caso, foi baixa devido ao fato do experimento ter sido realizado no inverno.

O teor alcoólico encontrado no experimento ($\pm 5\%$ v/v), apesar de estar de acordo com a literatura (de 4 a 14% v/v), foi baixo. Vários fatores podem explicar isso: a temperatura, o pH, possíveis contaminações microbiológicas que inibiram/competiram com a levedura, falta de homogeneização do mosto e a filtração. Essa última foi de extrema importância para a medida do teor alcoólico, uma vez que o alcoômetro é um densímetro. Portanto, um vinho de abacaxi mais turvo e denso influenciaria na leitura do teor alcoólico. A filtração foi realizada várias vezes para uma mesma amostra, porém, de maneira simples: com auxílio de um papel filtro. Outras técnicas como a filtração a vácuo também foram testadas, entretanto, sem muito êxito.

Segundo a Tabela dos Efeitos (Figura 9), que mostra a mudança sofrida pela variável resposta, quando passamos do nível baixo do fator para o nível mais alto, nenhum dos resultados foi estatisticamente significativo. Este fato nos relata que estatisticamente nem a concentração de levedura e nem o °Brix influenciaram no teor alcoólico.

Pela análise da ANOVA, comparou-se o valor do $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , com 95% de confiança e, observou-se que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (1,23) é menor que o valor tabelado ($F_{0,05,3,3} = 9,227$), portanto os valores não são significativos.

Pela da Figura 12 foi possível localizar o ponto ótimo do experimento: 22°Brix e 0,9 g.L⁻¹ de concentração de levedura que corresponde ao valor máximo de cada variável. No entanto, ao invés de trabalharmos com um ponto isolado, podemos escolher uma faixa ótima para a fermentação. Nesse caso, pode-se dizer que os valores entre 0,6 e 0,9 g.L⁻¹ para a concentração de leveduras, juntamente com um °Brix entre 20 e 22 são valores ótimos para a fermentação.

7. Conclusão

O vinho de abacaxi pode ser um produto para o consumidor com um paladar diferenciado e que está sempre buscando novidades. Além disso, mostrou ser uma alternativa para evitar o desperdício de uma fruta que é muito cultivada no Brasil.

O planejamento experimental foi adequado para estudar, de forma eficiente e econômica, o efeito conjunto de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse. Foi possível analisar o efeito de cada variável de forma isolada e também a interação entre delas.

Apesar da Tabela dos Efeitos ilustrar que nenhuma das variáveis influenciaram estatisticamente no teor alcoólico, foi possível obter por meio da curva de nível, um ponto no qual a fermentação é otimizada: 0,9 g.L⁻¹ de concentração de levedura e 22°Brix. No entanto, deixa-se como sugestão não apenas um ponto ótimo, mas sim uma faixa na qual as variáveis são ótimas para a produção do vinho. Esta faixa corresponde aos valores entre 0,6 e 0,9 g.L⁻¹ para a concentração de leveduras e entre 20° e 22°Brix.

Este experimento pode ser considerado como um ponto de partida para futuros experimentos nos quais se possa explorar mais as variáveis estudadas e incrementar outras, como por exemplo, a temperatura. Assim, essa fica como sugestão para novos trabalhos que venham a otimizar ainda mais este experimento. De modo geral, pode-se concluir que o planejamento experimental é uma ferramenta valiosa para planejar e otimizar um determinado processo.

8. Referência Bibliográfica

AGRIANUAL 2008: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, 2008. 502 p.

ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa.** 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ASQUIERI E. R.; RABÊLO A. M. S.; SILVA A. G. M. **Fermentado de jaca: estudo das características físico-químicas e sensoriais.** Ciência e Tecnologia de Alimentos vol.28 n.4, Campinas, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>>.

BORGES, C. D.; CHIM, J. F.; LEITÃO, A. M.; PEREIRA, E.; LUVIELMO, M. M. **Produção de suco de abacaxi obtido a partir dos resíduos da indústria conserveira** – B.CEPPA, Curitiba, v.22, n- 1 p. 25-34, 2004.

BRASIL. Decreto Nº 2314, de 4 de setembro de 1997. **Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.** Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Decretos/Ant2001/Ant1999/Dec231497.htm>> Acesso em: 08/11/2014.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design.** Bioresource Technology, n.91, p.77-84, 2004. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/>>.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statística.** Rio de Janeiro: E-papers, 2003. 200p.

CERQUEIRA, D. P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar.** 2013. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. Universidade de São Paulo.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. **Preparação e caracterização do vinho de laranja.** Química Nova, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001. Disponível em <<http://www.scielo.br/>>.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos.** v.4. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. 593p.

MIGUEL, A. C. A.; ABRAHÃO. C.; DIAS, J. R. P. S.; SPOTO, M. H. F.; **Modificações sensoriais em abacaxi 'Pérola' armazenado à temperatura**

ambiente. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

MORETTO, E.; ALVES, R. F.; CAMPOS, C. M. T.; ARCHER, R. M. B. E PRUDÊNCIO, A. J. **Vinhos & Vinagres (Processamento e Análise).** Série Didática. Florianópolis: Editora da UFSC, 1988.

MORGADO, I. F.; AQUINO, C. N. P.; TERRA, D. C. T. **Aspectos econômicos da cultura do abacaxi: sazonalidade de preços no Estado do Rio de Janeiro.** Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, v.26, n.1, 2004.

NASCENTE, A. S.; COSTA, R. S. C.; MEDEIROS, J. N.; **Cultivo do abacaxi em Rondônia.** Sistemas de produção, 3. Disponível em < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>> Acesso em 08/11/2014.

OLIVEIRA A. S.; SANTOS, D. C.; SILVA, F. L. H.; FLORENTINO, E. R. **Produção de Fermentado Alcoólico do Fruto de Mandacaru sem Espinhos (*Cereus jamacaru*).** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.13, n.3, p.271 -277, Campina Grande, 2011.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

PARENTE, G. D. L.; ALMEIDA, M. M.; SILVA, J. L.; ALVES, M. F. **Cinética da produção do fermentado alcoólico de abacaxi “pérola” e caracterização da bebida.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, Mossoró, v.9, n.2, 2014.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; MANFROI, L. **Sistema de Produção de Vinho Tinto, (Embrapa Uva e Vinho).** Sistemas de Produção 12, 2006.

SARAMAGO, S. P.; STEFFEN, V.; SILVA, J. D.; PEREIRA, S. S. F. **Planejamento de experimentos e otimização de sistemas mistos.** FAMAT em Revista, n.11, 2008.

SCHMIDELL W.; LIMA U. A.; AQUARONI E.; BORZANI W. **Biotechnologia industrial – Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Edgard Blucher, 2001 Vol.2 541p.

SILVA, J. L. A.; DANTAS, D. L. L.; GASPARETO, O. C. P.; FILHO, R. S. F. **Utilização de abacaxi para a elaboração de vinhos: avaliação físico-química e aceitabilidade.** Holos, v.3, Ano 26, 2010.

TAVARES, J. T. Q.; **Produção de fermentado alcoólico de cana-de-açúcar, caracterização e avaliação do seu envelhecimento.** 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, Bahia.

VIEIRA, C. R. **Dossiê Técnico – Produção de fermentados a partir de frutas.** Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), 2012.

WANG, Z. W.; LIU, X. L.; **Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. Using response surface methodology.** Bioresource Technology, n.99, p.8245-8251, 2008.

WANG, J.; WAN, W. **Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review.** International journal of hydrogen energy, n.34, p.235-244, 2009.