

**AUTORES**  
AUTHORS

✉ **Fernando José de GÓES\***  
**Teresa Cristina ZANGIROLAMI**

Universidade Federal de São Carlos  
Campus São Carlos  
Rodovia Washington Luís (SP-310), Km 235  
São Carlos - São Paulo - Brasil  
CEP: 13565-905  
e-mail: goeseq@hotmail.com

**RESUMO**

A maior fatia do mercado de vinhos no Brasil corresponde aos vinhos comuns produzidos a partir de uvas de mesa. Apesar da importância deste mercado, os estudos voltados para o desenvolvimento do processo são praticamente inexistentes. O objetivo do presente trabalho foi estudar a produção de vinho proveniente da uva, variedade Itália, investigando-se a produção de etanol, glicerol e acidez volátil, tendo a fermentação turbulenta ocorrida na presença e ausência da casca da uva em diferentes condições de pH inicial e temperatura.

Foram realizados 22 ensaios no DEQ/UFSCar, utilizando um fermentador de 1L e seguindo um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ampliação em estrela. As condições das fermentações investigadas 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. Em todos os ensaios foi utilizado como meio de cultivo o mosto de uva da variedade Itália, o qual foi obtido nas dependências da Viti-Vinícola Góes (São Roque, SP), após a uva ter sofrido o processo de moagem seguido por sulfitação. O microrganismo promotor da fermentação foi predominantemente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual foi obtida na Viti-Vinícola Góes.

A determinação dos açúcares redutores totais foi realizada pelo método DNS, HPLC, foi utilizada para a determinação das concentrações de etanol e glicerol e a acidez volátil foi determinada pelo método de Cazenave-Ferré.

Os resultados obtidos mostraram que a produção de etanol a partir da uva Itália é apreciável, obtendo-se em média uma graduação alcoólica de 10,3°GL. Notou-se que a produção de etanol foi maior nas fermentações ocorridas em baixa temperatura e alto pH inicial, em meio de cultivo isento de cascas. Modelos empíricos representando a variação da concentração de etanol, glicerol e acidez volátil, em função da temperatura e do pH inicial, foram obtidos e submetidos à otimização para maximização da formação de etanol e glicerol e à minimização da acidez volátil.

Apoio: Capes

**SUMMARY**

Common wines produced from cheap grapes constitute the biggest share of the Brazilian wine market. Despite the importance of this market, no studies concerning process development are found. The objective of the present work was to study wine production from grapes variety Italia by evaluating ethanol, glycerol and acetic acid formation during turbulent fermentations performed in the presence and absence of skin, under different pH and temperature conditions.

Twenty two experiments were carried out in the laboratory facilities of Ch. Eng. Dpt. (UFSCar) using 1 liter homemade fermentors and following a 2<sup>2</sup> factorial design complemented with a star configuration. Fermentation conditions with initial pH values of 2.8, 3.0, 3.3, 3.6 e 3.8 and temperatures of 18, 20, 24, 28 e 30°C were investigated. In all runs, the Italia variety grape juice was employed as cultivation medium, which was obtained at the Góes Wine-cellar (São Roque, SP, Brazil) as soon as the grape was crushed, followed by sulfite addition. The microorganism promoting the fermentation was predominantly the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which was harvested directly from fermentation vat located at Góes Wine-cellar.

The determination of total reducing sugar concentrations was performed by colorimetric DNS method, while ethanol and glycerol concentrations by HPLC and the final acetic acid concentration by Cazenave-Ferré method.

The experimental results showed that a meaningful production of ethanol from the Italia variety grape could be achieved, reaching an alcoholic graduation of 10,3°GL. It was also observed that the highest ethanol production was attained in the fermentations carried out at lower temperatures and higher initial pH values, in cultivation medium without skin. Empirical models representing the variation of ethanol, glycerol and volatile acidity concentrations as functions of temperature and initial pH were obtained and optimized in order to find the cultivation conditions for maximization of ethanol and glycerol formation as well as minimization of volatile acidity production.

Work supported by Capes.

**PALAVRAS-CHAVE**  
KEY WORDS

Fermentação alcoólica, vinho, Uva Itália, levedura /  
Alcoholic fermentation, wine, "ITALIA" grape, yeast.

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, inúmeros estudos vêm sendo realizados sobre a produção de vinhos obtidos a partir das uvas viníferas classicamente utilizadas na viticultura (Cabernet Sauvignon, Merlot e outras), mas poucas pesquisas abordam a produção de vinhos comuns, elaborados a partir de uvas americanas e híbridas, predominantemente consumidos no mercado brasileiro. Dados da Embrapa indicam que, do volume total produzido em 2003 na região da Serra Gaúcha, responsável por mais de 90% da produção nacional de vinhos, 80 % foi de vinhos comuns, enquanto que apenas 20% correspondeu à produção de vinhos finos, elaborados a partir de uvas viníferas.

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, o 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.

Dentre os fatores estudados, com mais frequência nos trabalhos sobre a produção de vinho, destacam-se a temperatura e o pH do meio de cultivo. A temperatura é um dos mais importantes parâmetros para o desenvolvimento da fermentação alcoólica, pois ela pode afetar tanto a cinética do processo assim como a qualidade final do vinho. Ao se promover fermentações a baixas temperaturas, possibilita-se o aumento da produção e retenção dos aromas, o que pode favorecer uma melhora no perfil aromático do vinho. Entretanto, baixas temperaturas levam a uma menor velocidade de crescimento de leveduras, prolongando o processo, e, dependendo da espécie de levedura empregada na fermentação, a um aumento na concentração de ácidos voláteis indesejáveis (TORIJA et al., 2003). Por outro lado, temperaturas acima de 33°C podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, em especial, da bactéria *Acetobacter*, promotora da azedão do vinho (PATO, 1998). O pH do meio de cultivo é outro importante fator para o bom desenvolvimento da fermentação, pois ele influi tanto no crescimento quanto na formação de produto (HASHIZUME, 2001). Sabe-se que um vinho de pH inferior a 3,4 apresenta uma notável resistência ao ataque de bactérias, principalmente a *Bacterium Tartareophorum* promotora da doença "volta". Já em um vinho de pH superior a 3,6 pode ocorrer o desenvolvimento da flora microbiana prejudicial (PATO, 1998).

Por outro lado, fermentações conduzidas em meios excessivamente ácidos tornam-se muito lentas devido à baixa velocidade de crescimento da levedura.

Aspectos relacionados ao processo de preparação do mosto também são importantes para a obtenção de um produto com as características desejadas. A produção de vinho branco de qualidade depende da separação do mosto imediatamente após o esmagamento (RIZZON, 1996). O mosto obtido, após um certo período de contato do suco com a casca, apresenta um maior teor fenólico e coloração mais intensa do que o mosto obtido por prensa direta, o que acarreta prejuízos na aparência, aroma e sabor do vinho. Martin e colaboradores (2003) mostraram que a redução do tempo de contato do suco com a casca, sob temperatura adequada, contribuiu para minimizar o problema de coloração mais intensa. Porém, os mesmos autores afirmam que, quando a separação da casca ocorre após a fermentação turbulenta, obtém-se um maior rendimento de mosto e um maior teor de compostos fenólicos considerados benéficos para a saúde humana.

Analisando os aspectos sobre a produção de vinho mencionados anteriormente, observa-se que a escolha das condições de fermentação (pH, temperatura e meio de cultivo) é fundamental para garantir a qualidade do vinho e o rendimento do processo. Da mesma forma, a escolha da matéria-prima mais adequada é imprescindível para assegurar a competitividade do produto. O objetivo deste trabalho é estudar a produção de vinho branco comum a partir de uva variedade "Itália", reproduzindo em laboratório as condições empregadas na vinícola Góes: 1) investigando-se a influência da temperatura, do pH inicial e da presença ou ausência de casca na fermentação alcoólica do suco da referida uva, em termos de produção de etanol, glicerol e ácido acético. 2) empregando o planejamento experimental por análise de superfície de resposta, otimizar as condições de cultivo que permitam a obtenção de um produto de boa qualidade a partir de uma uva de baixo custo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo

Os microrganismos promotores das fermentações foram obtidos do próprio meio fermentativo empregado pela Viti-Vinícola Góes (leveduras indígenas), onde predomina a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.2 Preparo do meio de cultivo

Em todos os ensaios foi utilizado o mosto de uva da variedade Itália proveniente da cidade de São Miguel Arcanjo (SP), obtido nas dependências da Viti-Vinícola Góes (São Roque SP). No preparo do meio de cultivo para os ensaios na presença de casca, adotou-se o seguinte procedimento: após a uva ter sofrido o processo de separação do engaço e posterior moagem, adicionou-se 200 mg de metabissulfito de potássio por litro de mosto para eliminar 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 preparo 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 moagem, 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. Como a concentração de sólidos solúveis no mosto de uva da variedade Itália obtido na Vinícola Góes e aferido por um refratômetro, foi de 13,5°Brix, antes do início de cada ensaio, 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. Essa questão passou a ser pertinente para os vinicultores após o desenvolvimento do controle e inspeção de alimentos, utilizando a metodologia isotópica, o que impede que ocorra adulteração dos vinhos com o emprego de álcool proveniente da cana-de-açúcar (OLIVERIA et al. 2002). Finalmente, antes da transferência do inóculo, foi promovida a correção do pH para o valor desejado por meio de adição de carbonato de cálcio ou de ácido tartárico.

### 2.3 Preparo de cultura estoque

Os microrganismos coletados nas dornas da Viti-Vinicola Góes foram incubados em meio sintético (água 20g/L, glicose 20g/L, extrato de levedura 5g/L, cloreto de potássio 5g/L, cloreto de amônio 1,5g/L, fosfato diácido de potássio 5,0g/L, sulfato de magnésio 0,7g/L). Após total colonização da superfície do meio sólido, adicionou-se 15 mL de glicerol estéril a cada tubo de ensaio contendo a cultura estoque, sendo que os mesmos foram mantidos sob refrigeração até o início de cada ensaio.

### 2.4 Preparo do inóculo

Células presentes na cultura estoque armazenada sob refrigeração foram inicialmente transferidas para meio sólido fresco com a mesma composição descrita anteriormente (repique) e incubadas por 24 a 48 horas até pleno crescimento na superfície. O inóculo foi preparado, transferindo-se as células reativadas para 50mL do mosto da uva sem casca com pH de 3,3, mantendo-as sob incubação à temperatura de 24°C até se obter uma concentração de aproximadamente 107 células/mL, verificada por contagem em câmara de Neubauer. De acordo com PATO (1988), esta é a concentração ideal para se iniciar uma fermentação.

### 2.5 Métodos analíticos

Na determinação dos açúcares redutores totais foi

empregado o método colorimétrico DNS, após a hidrólise da sacarose pelo método descrito por FALCONE e MARQUES (1965). As análises de etanol e glicerol presentes nas amostras dos vinhos amadurecidos foram realizadas por HPLC (Waters Chromatography Division Millipore Co.), com uma coluna do tipo troca iônica, modelo Ionpak® KS\_G (Shodex®). A determinação da acidez volátil foi realizada pelo método titulométrico Cazenave-Ferré, sem correção da quantidade de dióxido de enxofre (MORETTO et al., 1988).

### 2.6 Procedimento experimental

Os experimentos foram planejados e executados segundo o Método de Análise por Superfície de Resposta, que é baseado no planejamento fatorial 2<sup>n</sup>, sendo n igual ao número de variáveis, e pode ser aplicado de forma satisfatória quando se quer conhecer uma relação funcional existente entre a resposta e os fatores (BARROS NETO, 2002). Porém, como se desejava ajustar uma expressão empírica de segunda ordem, descrevendo a variável resposta em função das variáveis independentes, foi necessário aplicar o chamado planejamento em estrela (BARROS NETO, 2002).

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 (MYERS, 1976; HAALAND, 1989). A codificação das variáveis foi feita através da Equação (1) (MYERS, 1976):

$$1. x_i \text{ codificado} = \frac{x_i - \bar{x}_i}{x/2}$$

Onde:

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

$$3. x = x_{+1} - x_{-1}$$

$x_i$  = valor das variáveis em unidades originais, fixado no planejamento fatorial em dois níveis (-1 e +1);

$x_i$  = valor da variável que se quer codificar na unidade original.

Os valores das variáveis temperatura e pH inicial nas unidades originais assim como os valores codificados obtidos pelas Eqs. (1) a (3) são apresentados na Tabela 1.

Seguindo a metodologia proposta, para a realização do planejamento fatorial com duas variáveis (pH e temperatura) em dois níveis, são necessários 4 ensaios correspondentes às combinações 2 a 2 de variáveis e níveis (ensaio 1 a 4, na Tabela 1), complementados por 3 ensaios no ponto central (ensaio 5 a 7, na Tabela 1). Para a ampliação em estrela, são necessários mais 4 ensaios (8 a 11, na Tabela 1), totalizando 11 ensaios com

**Tabela 1** Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central e sua ampliação através do planejamento estrela, para estudar o efeito da temperatura e do pH na fermentação do mosto de uva Itália: valores nas unidades originais e valores codificados.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>
1	20	3	-1	-1
2	28	3	1	-1
3	20	3,6	-1	1
4	28	3,6	1	1
5	24	3,3	0	0
6	24	3,3	0	0
7	24	3,3	0	0
8	30	3,3	$\sqrt{2}$	0
9	24	3,8	0	$\sqrt{2}$
10	18	3,3	$-\sqrt{2}$	0
11	24	2,8	0	$-\sqrt{2}$

o meio de cultivo isento de cascas e mais 11 ensaios com meio de cultivo contendo cascas, que foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar), utilizando 3 reatores, de construção caseira, com 1,2 L de capacidade/ cada, constituídos por 3 frascos tipo kettle com tampas de aço inox, dotados de um sistema para controle de temperatura. Todos os ensaios foram iniciados transferindo-se 50 mL de inoculo para 950 mL de meio de cultivo, resultando em uma razão (volume de inoculo/volume de meio) de 5% (v/v), que está dentro da faixa recomendada por HASHIZUME (2001). Convém ressaltar ainda que na Vinícola Góes a fração de pé-de-cuba empregada também está em torno de 5%.

Transcorridas 72 horas de fermentação, o vinho que estava no reator foi transferido para outro recipiente previamente preparado, tomando-se o cuidado de não se transferir a casca e o depósito formado. Após 20 dias promoveu-se a separação do vinho da borra (partículas sólidas sedimentadas), operação denominada *trasfega*. Decorrido 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 500 mL, sendo que amostras deste último foram coletadas e congeladas, para posteriormente serem submetidas a análises para a determinação da concentração de etanol, glicerol e acidez volátil no vinho final.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados, sob as condições experimentais indicadas na Tabela 1 para os dois

meios de cultivo utilizados, foram submetidos à modelagem empírica por ajuste de um polinômio de segunda ordem, buscando correlacionar as variáveis respostas (concentrações de etanol, glicerol e de acidez volátil) e com as variáveis independentes (pH e temperatura). Os polinômios ajustados e as respectivas superfícies de resposta foram obtidos pelo programa Statistica 5.1. Para a otimização das condições de cultivo escolheu-se como função objetivo a maximização das concentrações de etanol e glicerol, juntamente com a minimização da concentração da acidez volátil. Para tanto foi empregado um algoritmo de otimização programado em Fortran (Moreira, 2004), que atribuía valores aleatórios às variáveis independentes e, utilizando as correlações geradas pelo Statistica 5.1, calculava o valor otimizado de cada variável resposta. Além disso, para a otimização simultânea das variáveis respostas foi empregado o método de multi-resposta, o qual está baseado no fator de desejabilidade de cada resposta (BARROS NETO, 2002).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores codificados das condições de pH inicial e temperatura, assim como os resultados obtidos nos vinte e dois ensaios executados em termos produção de etanol, glicerol e acidez volátil no vinho final, em meio de cultivo proveniente da uva da variedade Itália, na presença ou ausência da casca, estão resumidos na Tabela 2.

É interessante notar que os valores de A.R.T no vinho final, apresentados na Tabela 2 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 sexto ensaio, onde foram empregados pH inicial de 2,8 e alta concentração de SO<sub>2</sub>, 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 SO<sub>2</sub> deva ser alterada, segundo 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 Viti-Vinícola Góes utilizou-se uma quantidade de metabissulfito de potássio um pouco superior à recomendada por HASHIZUME (2001) e RIZZON (1996), pois foram 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.

Outro fato importante observado nos dados apresentados na Tabela 2 é que em apenas dois ensaios (3 e 10) realizados na ausência de casca, obteve-se uma graduação alcoólica abaixo da exigida pela legislação brasileira (10°GL ou aproximadamente 80g/L) para que o fermentado de uva seja classificado como vinho de mesa. Entretanto, nos experimentos realizados na presença de casca apenas três fermentações (15, 19 e 22) atingiram essa graduação alcoólica. Em média, os vinhos produzidos na presença de casca apresentaram uma concentração de etanol de 79,11g/L contra

83,81g/L dos vinhos produzidos na ausência de casca, o que pode ser atribuído à retenção no bagaço de uma parte do meio líquido contendo etanol.

De acordo com a literatura, 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 2, onde verifica-se 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.

Ainda de acordo com a literatura, a quantidade de glicerol normalmente presente nos vinhos corresponde a uma fração que varia entre 1/10 e 1/5 da quantidade de etanol produzida (HASHIZUME, 2001). Analisando-se os valores apresentados para a concentração de glicerol e etanol na Tabela 2, nota-se que a produção de glicerol foi relativamente baixa, sendo que em nenhuma das vinte e duas fermentações não atingiu-se nem o limite mínimo esperado. Porém, sabe-se que o teor de glicerol nos vinhos depende de diversos fatores, entre os quais a concentração e tipo de substrato, assim como a

variedade de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada tem grande importância (YALÇIN, 2003).

O teor de acidez volátil, que mede o grau de avinagemamento 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 vinho novo não deveria apresentar mais que 10 meq/L ou 0,60 g/L de acidez volátil expressa em ácido acético. 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, 1996). Com base nessas informações, nota-se pelos valores listados na Tabela 2 para a concentração de acidez volátil, que os vinhos experimentais produzidos apresentam uma boa sanidade, mostrando que mesmo tendo como matéria-prima uvas "Itália" de qualidade inferior, foi possível produzir um vinho com um teor aceitável de acidez volátil.

A partir dos resultados relativos às concentrações de

**Tabela 2** Valores codificados das variáveis independentes, valores das variáveis respostas e da concentração de açúcares redutores totais (A.R.T.) obtidos do vinho final.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Acidez Volátil (g/L)	A.R.T (g/L)	
Fermentação Sem Casca	1	-1	85,91	4,22	0,66	1,30	
	2	+1	84,33	4,18	0,60	1,04	
	3	-1	+1	73,33	4,23	0,54	1,01
	4	+1	+1	82,05	4,92	0,48	1,27
	5	0	$-\sqrt{2}$	90,00	3,72	0,54	1,23
	6	$-\sqrt{2}$	0	87,92	5,63	0,66	8,64
	7	$\sqrt{2}$	0	84,22	4,42	0,48	1,27
	8	0	0	84,50	3,95	0,54	1,41
	9	0	0	83,51	4,14	0,48	1,38
	10	0	0	79,17	3,99	0,48	1,41
Fermentação Com Casca	11	0	$+\sqrt{2}$	86,97	3,98	0,48	1,27
	12	-1	-1	74,43	4,36	0,36	2,16
	13	-1	+1	70,37	4,25	0,42	1,90
	14	0	$-\sqrt{2}$	72,45	4,11	0,30	1,41
	15	+1	-1	92,93	4,58	0,42	1,49
	16	+1	+1	79,63	4,73	0,60	1,01
	17	$-\sqrt{2}$	0	78,78	5,06	0,42	1,97
	18	$\sqrt{2}$	0	76,76	5,53	0,30	1,41
	19	0	$\sqrt{2}$	86,75	5,43	0,48	1,68
	20	0	0	78,64	5,30	0,42	2,33
	21	0	0	79,48	5,64	0,48	2,38
	22	0	0	80,09	5,07	0,42	2,42

etanol e de A.R.T. no vinho final, pode-se estimar o fator de conversão de substrato em produto (YP/S) nos cultivos realizados. Considerando-se que as amostras iniciais de cada fermentação analisadas pelo Método de DNS indicaram uma concentração de 195 a 206g de açúcares redutores totais por litro de mosto, e que a concentração de A.R.T. no vinho final foi próxima de zero para a maioria dos experimentos, estimou-se um consumo médio de substrato de 200 g/L. Com base na maior concentração de etanol de todos os ensaios (92, 9 g/L, Experimento 15), tem-se que o maior valor YP/S obtido pelos experimentos realizados no presente trabalho foi em torno de 0,465 g etanol/g glicose. Para efeito comparativo, obteve-se na literatura (SHULER et al., 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. Ainda de acordo com PATO (1988), geralmente se obtém na prática um rendimento de etanol, em relação ao substrato consumido, próximo de 0,485.

O baixo valor obtido para o YP/S pode ser atribuído às leveduras selvagens utilizadas nos experimentos, que provavelmente não são as que possuem melhor rendimento em etanol. Estudos utilizando leveduras selecionadas estão em andamento e ajudarão a elucidar esta questão.

#### 4. ANÁLISE DOS RESULTADOS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

A partir dos valores apresentados na Tabela 2 e utilizando o software "Statistica" foram obtidas seis correlações empíricas, por ajuste de polinômios de segunda ordem, que descrevem a variação da concentração de etanol, glicerol e acidez volátil em função da temperatura e pH para as fermentações realizadas na presença e ausência de casca.

A Equação (4) mostra a forma geral da correlação, representando para a variável resposta (y) estudada em função das variáveis independentes (em valores codificados).

$$4. y = a + b.T + c.T^2 + d.pH + e.pH^2 + g.T.pH$$

Os valores dos coeficientes "a" a "g" estão resumidos nas Tabelas 3 a 5, respectivamente, para as respostas concentração de etanol, de glicerol e de acidez volátil.

A partir das correlações obtidas foram também traçadas

as superfícies de resposta, que estão representadas nas Figuras 1, 2 e 3. De posse das correlações e utilizando-se o programa feito em linguagem Fortran (MOREIRA, 2004), realizou-se a otimização das condições de cultivo de forma a obter máxima produção de etanol e glicerol, bem como a mínima concentração de acidez volátil no vinho de uva "Itália".

Figura 1 Superfícies de resposta representando a variação na concentração de etanol em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura indígena na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).

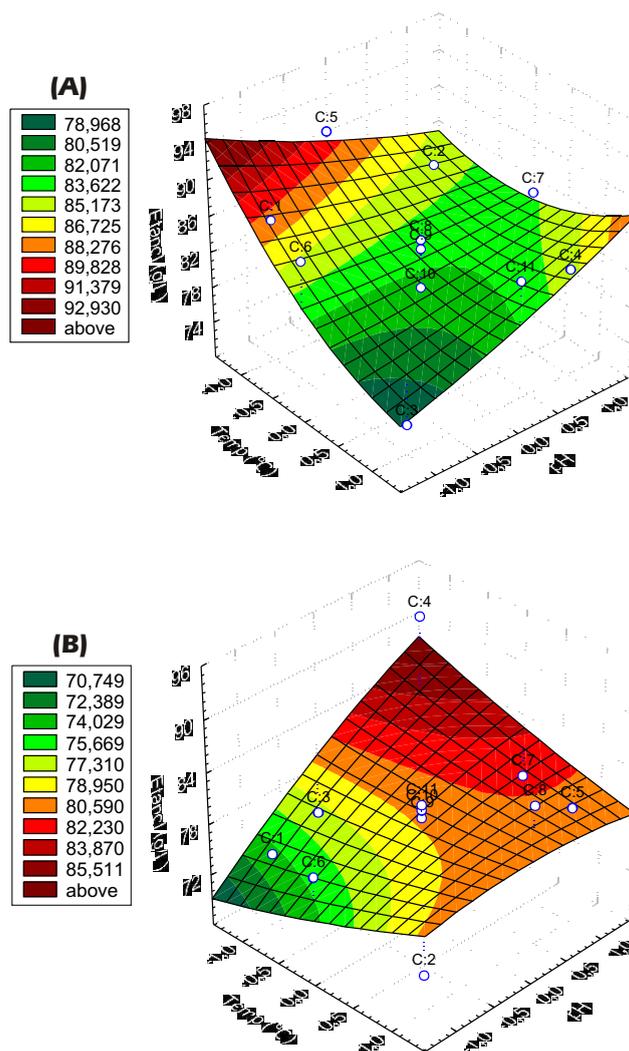


Tabela 3 Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta CET.

Presença da casca	Coeficientes						r	R <sup>2</sup>
	a	b	c	D	e	G		
Não	82,39	-2,39	1,58	0,24	0,37	2,57	0,6510	42,37
Sim	79,39	0,36	0,27	3,11	-0,65	-2,31	0,5093	25,94

#### 4.1 Concentração de Etanol (C<sub>ET</sub>)

Na Tabela 3 estão representados os valores obtidos para os coeficientes da correlação que fornece uma estimativa da variável resposta CET, 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 da porcentagem da variação explicada (coeficiente de determinação) (R<sup>2</sup>).

Os gráficos de superfície de resposta para a concentração de etanol obtidos a partir das correlações ajustadas aos dados experimentais, juntamente com os mesmos, estão apresentados na Figura 1.

Analisando a Tabela 3, nota-se que o efeito do pH é mais significativo do que o da temperatura na variável resposta CET, quando se fermentou com casca. Entretanto, quando se fermentou sem a casca da uva a temperatura apresentou um efeito mais significativo do que o pH. Além disso, observa-se que os valores para o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) dos experimentos foram baixos (R<sup>2</sup> = 42,37 e 25,94), indicando que a correlação de segunda ordem não representa satisfatoriamente os pontos experimentais.

#### 4.2 Concentração de Glicerol (C<sub>GLIC</sub>)

O estudo sobre o glicerol é importante porque ele contribui para a melhorar o paladar do vinho, proporcionando ao mesmo uma 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<sub>GLIC</sub> têm o mesmo formato da Equação (4), porém, nesse caso a variável dependente y é a CGLIC. Os coeficientes dessas correlações (fermentação sem casca e com casca) juntamente com os valores do coeficiente de correlação (r) e de determinação (R<sup>2</sup>) estão apresentados na Tabela 4.

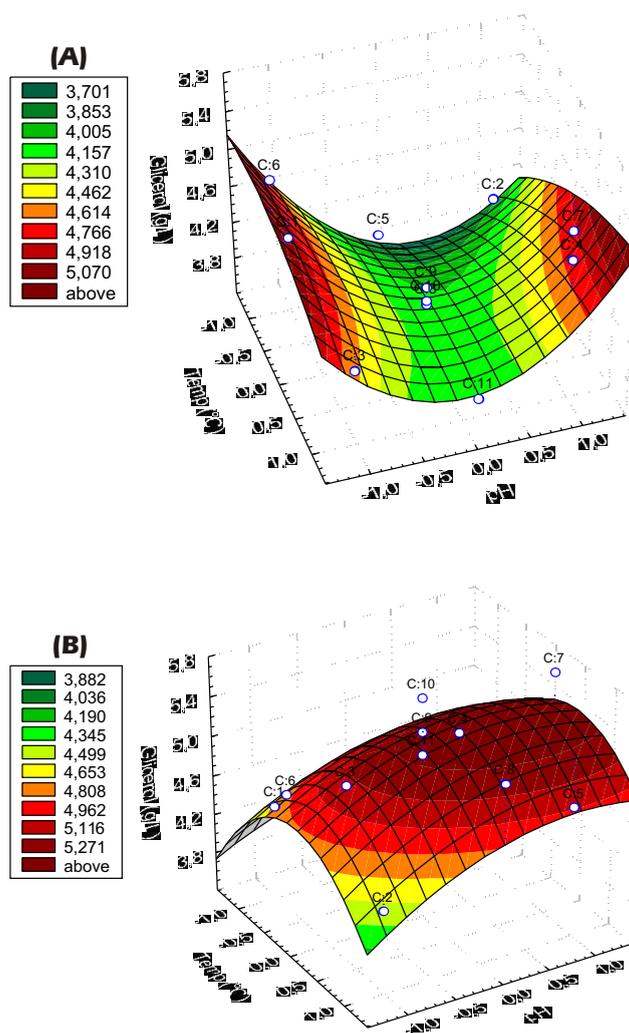
Os gráficos de superfície de resposta para a concentração de glicerol obtidos dos dados coletados nas fermentações realizadas com presença e ausência de casca estão apresentados na Figura 2.

Analisando a Tabela 4, nota-se que tanto a temperatura quanto o pH produzem um pequeno efeito sobre a concentração de glicerol (CGLIC). Além disso, observa-se que os valores para o coeficiente de correlação (r) estão próximos de 0,8 e 0,9, indicando que a correlação de segunda ordem representa satisfatoriamente os pontos experimentais.

#### 4.3 Concentração de Acidez Volátil (CAc.V)

As correlações para a variável resposta CAc.V têm a mesma forma da Equação (4), entretanto, a variável dependente é a CAc.V. Os coeficientes dessas correlações juntamente com os valores do coeficiente de correlação (r) e de determinação (R<sup>2</sup>) estão apresentados na Tabela 5.

**Figura 2** Superfícies de resposta representando a variação na concentração de glicerol em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura indígena na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).



**Tabela 4** Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta C<sub>GLIC</sub>

Presença da casca	Coeficientes						r	R <sup>2</sup>
	a	b	c	d	e	g		
Não	4,03	0,14	-0,10	-0,13	0,49	0,18	0,8617	74,26
Sim	5,34	0,24	-0,42	0,17	-0,16	0,06	0,7681	59,00

Na Figura 3 são apresentadas os gráficos de superfície de resposta para a concentração de acidez volátil.

Nota-se pelos valores dos coeficientes apresentados na Tabela 5 que ambas variáveis de entrada (temperatura e pH) têm pequeno efeito sobre o teor de acidez volátil presente no vinho. Além disso, verifica-se que a correlação de segunda ordem representou mais significativamente essa variável resposta do que as outras anteriormente analisadas.

Verifica-se que em todas as variáveis respostas analisadas, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi maior nas fermentações realizadas sem casca do que nas realizadas com casca. Isso se deve muito provavelmente ao fato de que se fermentando com casca no momento da primeira trasfega ocorre uma etapa de separação do bagaço, o que pode estar provavelmente gerando uma maior variação entre os experimentos, o que dificulta a obtenção de uma correlação entre eles.

#### 4.4 Otimização das condições de cultivo

Na Tabela 6 são apresentados os valores ótimos das variáveis respostas obtidos através da aplicação do método de multi-resposta.

Deve-se salientar que essa otimização buscou obter a combinação de temperatura e pH inicial que fornece a maior concentração de etanol e glicerol e concomitantemente o menor teor de acidez volátil.

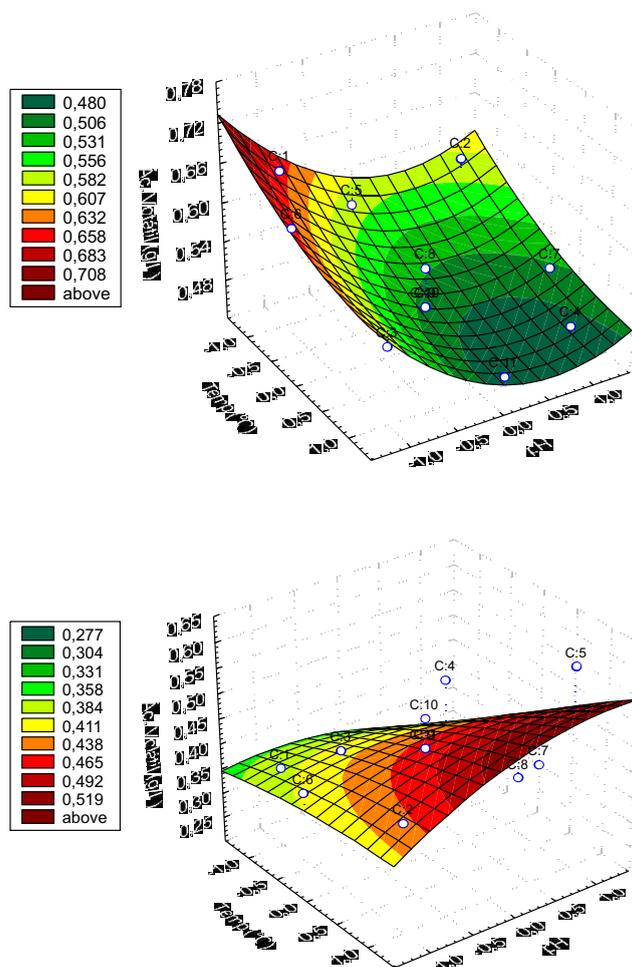
Observa-se na Tabela 6 que os valores ótimos obtidos para a fermentação sem casca fornecem um vinho de melhor qualidade (maior concentração de etanol e glicerol e baixo teor de acidez volátil) do que o fermentado com casca. Porém, deve-se ressaltar que devido ao método de otimização utilizar as correlações empíricas fornecidas pelo software Statistica 5.1, as quais não apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, essa otimização pode apresentar um certo distanciamento da realidade.

Além disso, nota-se que tanto para a fermentação com casca, quanto para sem casca, os valores máximos de concentração de etanol e glicerol e mínimos de concentração de acidez volátil foram obtidos com o maior pH inicial estudado. Entretanto, a literatura recomenda que o pH final do vinho seja inferior a 3,3 para garantia quanto à sanidade do vinho (PATO, 1998), de forma que a realização de fermentações vínicas no valor estimado pela otimização deve ser considerada com cautela.

Com relação à temperatura ótima, observa-se que o valor estimado pela otimização para o fermentado sem casca é

de 29.6°C. Esse valor deve ser interpretado com cuidado, visto que em cultivos conduzidos com essa temperatura relativamente alta, o vinho pode perder suas qualidades organolépticas, 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 CATALUÒA (1984).

**Figura 3** Superfícies de resposta representando a variação na concentração de acidez volátil em função da temperatura e do pH, para fermentação com levedura indígena na ausência de casca (a) e na presença de casca (b).



**Tabela 5** Valores dos coeficientes para a correlação da variável resposta C<sub>AcV</sub>

Presença da casca	Coeficientes						r	R <sup>2</sup>
	a	b	c	D	e	G		
Não	0,50	-0,04	0,01	-0,05	0,04	0,00	0,9012	81,21
Sim	0,44	0,06	-0,01	0,01	-0,02	0,03	0,7201	51,86

**Tabela 3.5** 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.

Presença da casca	Temperatura (°C)	pH	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Ac. Volátil (g/L)
Não	29,6	3,80	88,34	5,18	0,473
Sim	22,0	3,80	83,94	5,01	0,363

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou estudar alternativas para o importante mercado de vinhos comuns no Brasil, que contribuam para melhorar a qualidade do produto, minimizar os custos de produção por meio da utilização de uvas não convencionais e desenvolver a tecnologia para este processo fermentativo. A expressiva formação de etanol 83,81 g/L, ou seja, aproximadamente uma graduação alcoólica de 10,5°GL, para o fermentado sem casca, assim como os baixos valores para a concentração da acidez volátil, demonstraram que a produção de vinho branco a partir de uvas da variedade Itália tem um grande potencial de ser utilizada pelas vinícolas de São Roque. Além disso, como na média a graduação foi superior a 10°GL, esse fermentado pode segundo a legislação brasileira, ser classificado como um vinho de mesa. O desenvolvimento de um procedimento simples para o preparo do mosto isento de cascas e os resultados superiores obtidos (maiores concentrações de etanol e glicerol juntamente com a menor concentração de acidez volátil) 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 o procedimento proposto.

Analisando os coeficientes dos modelos empíricos ajustados, verificou-se que as variáveis independentes pH 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.

Os resultados da otimização devem ser considerados com reserva devido à baixa capacidade preditiva dos modelos ajustados. A realização de um maior número de ensaios pode ser necessária para melhorar o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLI, A.; FLARI, V.; SAKELLARAKI, E.; SCHOINA, V.; ICONOMOPOULOU, M.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M. 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; 2ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2002.

CATALUÒA, E. Uvas e Vinhos. Rio de Janeiro: Editora Globo, 1984.

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.

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, pg. 24-30, 1965.

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

HASHIZUME, T. *Tecnologia do Vinho*. Em: BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. *Biotechnology Industrial Biotecnologia na produção de alimentos*. v. 4, São Paulo: Editora Edgard Blücher, 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.

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.

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

MORETTO, E. *Vinhos e Vinagres Processamento e Análises*. Florianópolis: Editora da UFSC, 1988.

MYERS, R. H. *Response surface methodology*, U.S.A., Library of Congress, 1976.

OLIVEIRA, A. C. B.; SALIMON, C. I.; CALHEIROS, D. F.; FERNANDES, F. A.; VIEIRA, I.; CHARBEL, L. F.I; PIRES, L. F.; SALOMÃO, M. S. M. B.; NOGUEIRA, S. F.; VIEIRA, S.; MOREIRA, M. Z.; MARTINELLI, L. A.; CAMARGO, P. B. 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*. 10ed. Lisboa: Clássica Editora, 1998.

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

SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering - Basic Concepts*. New Jersey: Prentice Hall, 1992.

TORIJA, M. J.; POBLET, M.; NOVO, M.; BELTRAN, G.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A.; ROZÉS, N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Inter. Journal of Food Microbiology*, v.85, p. 127-136, 2003.

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*, 2003.