



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS – CAMPUS POUSO ALEGRE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GLÁUCIA FARIA DE MIRANDA

**ESTUDO CINÉTICO E ANÁLISE DE PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
PROCESSO DE PRODUÇÃO EM BATELADA DO VINHO DE MORANGO
FERMENTADO COM GRÃOS DE KEFIR**

POUSO ALEGRE

2019

GLÁUCIA FARIA DE MIRANDA

**ESTUDO CINÉTICO E ANÁLISE DE PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
PROCESSO DE PRODUÇÃO EM BATELADA DO VINHO DE MORANGO
FERMENTADO COM GRÃOS DE KEFIR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Engenharia Química do IFSULDEMINAS –
Campus Pouso Alegre como requisito de
avaliação parcial à obtenção do grau de
bacharel em Engenharia Química.
Orientadora: Prof. Dra. Núria Angelo
Gonçalves.

**POUSO ALEGRE
2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
IFSULDEMINAS – Campus Pouso Alegre
Biblioteca Paulo Freire**

Miranda, Gláucia Faria de.

Estudo cinético e análise de parâmetros operacionais do processo de produção em batelada do vinho de morango fermentado com grãos de kefir / Gláucia Faria de Miranda. -- 2019.

49 f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Núria Angelo Gonçalves.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
IFSULDEMINAS -- Campus Pouso Alegre, Curso de Graduação em Engenharia Química, Pouso Alegre, 2019.

1. Vinho de morango. 2. Grãos de kefir. 3. processo batelada e Monod. I. Gonçalves, Núria Angelo, orient. II. Título.

Elaborada pelos Bibliotecários do IFSULDEMINAS – Campus Pouso Alegre
Eric Fabiano Esteves – CRB6/2254
Michelle Rose Araujo Santos de Faria – CRB6/2006

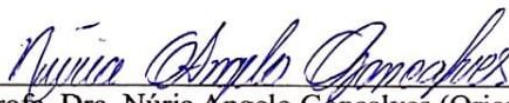
GLÁUCIA FARIA DE MIRANDA

**ESTUDO CINÉTICO E ANÁLISE DE PARÂMETROS OPERACIONAIS DO
PROCESSO DE PRODUÇÃO EM BATELADA DO VINHO DE MORANGO
FERMENTADO COM GRÃOS DE KEFIR**

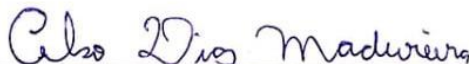
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Engenharia Química do IFSULDEMINAS –
Campus Pouso Alegre como requisito de
avaliação parcial à obtenção do grau de
bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em: 22/11/2019.

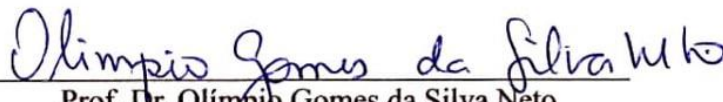
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª. Dra. Núria Angelo Gonçalves (Orientadora)
IFSULDEMINAS



Prof. Me. Celso Dias Madureira
IFSULDEMINAS



Prof. Dr. Olímpio Gomes da Silva Neto
IFSULDEMINAS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, por estar comigo sempre, por ter feito tudo da melhor maneira para mim.

Aos meus pais, Lúcia e Geraldo, que me faltam palavras para descrever tudo que fizeram por mim, se não fosse vocês eu não estaria aqui. Minha base para tudo.

Aos meus irmãos, Gianna e Júnior, que sempre são meu ponto guia. São meus exemplos, meus grandes amores e minhas alegrias.

Ao meu companheiro Gabriel, por todo o apoio e ajuda para conseguir concluir, você foi peça fundamental para isso.

Aos meus cunhados e meu sobrinho de coração, Caio, por todo o carinho, amor e incentivo.

A todos da minha família e aos meus sogros, Mário e Elaine, que sempre me incentivaram.

Aos meus amigos que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A minha orientadora Núria Angelo, por toda dedicação, paciência e amizade nesse processo. Eu não teria conseguido sem você.

Ao meu professor e orientar da iniciação científica João Lameu, por toda ajuda e disponibilidade de sempre. Principalmente na etapa final do curso.

Ao meu professor Celso Dias por ter sido o *sommelier* dos vinhos produzidos e por toda ajuda sempre.

Aos professores Olímpio e Rejane, e a todos os outros que me acompanharam durante toda esta jornada, muito obrigada por todo o conhecimento passado.

Ao amigo Humberto Baungartem, por me ajudar no fornecimento dos morangos. E, ao Ronaldo Herculano, pelo fornecimento de todos os morangos para os experimentos.

Gláucia Faria de Miranda

“A vida segue sempre em frente, o que se há de fazer” – Toquinho.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar os parâmetros operacionais (tempo, temperatura e agitação) e determinar os parâmetros cinéticos da produção do vinho de morango, utilizando o kefir como fermento. Foram realizados dez experimentos seguindo uma tabela de planejamento experimental, variando os valores de tempo, temperatura e agitação. Para realizar os experimentos foi produzido um mosto com morango e xarope de açúcar, para posterior adição dos grãos de kefir, usando reatores em batelada, com controle de temperatura e agitação. Foram analisados os valores de concentração de substrato (C_s) e concentração de produto (C_p) em função do tempo, em que todos os experimentos se mostraram eficientes, pois os valores de C_s diminuíram com o tempo. A partir dos dados obtidos, foi possível gerar superfícies de resposta utilizando o *software* Minitab, em que, para maiores valores dos parâmetros operacionais, ocorreu uma maior conversão de reagentes em produtos, sendo que o experimento 8 (72 h; 30° C; 65 rpm) se mostrou o melhor dentre os experimentos. Por fim, utilizando os dados do experimento 8, foi realizado os cálculos dos parâmetros cinéticos da equação de Monod para a reprodução do kefir.

Palavras – chave: vinho de morango, grãos de kefir, processo batelada e Monod.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the operational parameters (time, temperature and agitation) and to determinate the kinetic parameters of strawberry wine production, using kefir as yeast. Ten experiments were performed following an experimental planning table, varying the values of time, temperature and agitation. To perform the experiments, a must with strawberry and sugar syrup was produced for later addition of kefir grains, using batch reactors, with temperature control and stirring. Substrate concentration (C_s) and product concentration (C_p) values were analyzed as a function of time, in which all experiments were effective, as C_s values decreased with time. From the obtained data, response surfaces were generated using the Minitab software. Experiments have shown that for higher values of the operational parameters, here was a greater conversion of reagents into products, besides the experiment 8 (72 h; 30° C; 65 rpm) was the best among the experiments. Finally, using data from experiment 8, the kinetic parameters were calculated from the Monod equation for kefir reproduction.

Keywords: strawberry wine, kefir grains, batch process and Monod.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva de crescimento microbiano em cultivo em batelada.	19
Figura 2 - Reatores em batelada.	24
Figura 3 - Reatores preenchidos com o mosto e os grãos de kefir.	25
Figura 4 - Análise da concentração com o tempo do experimento 1.	28
Figura 5 - Análise da concentração com o tempo do experimento 2.	28
Figura 6 - Análise da concentração com o tempo do experimento 3.	29
Figura 7 - Análise da concentração com o tempo do experimento 4.	30
Figura 8 - Análise da concentração com o tempo do experimento 5.	30
Figura 9 - Análise da concentração com o tempo do experimento 6.	31
Figura 10 - Análise da concentração com o tempo do experimento 7.	32
Figura 11 - Análise da concentração com o tempo do experimento 8.	32
Figura 12 - Análise da concentração com o tempo do experimento 9.	33
Figura 13 - Análise da concentração com o tempo do experimento 10.	33
Figura 14 - Relação entre Temperatura, agitação e ΔC_s	34
Figura 15 - Relação entre Temperatura, tempo e ΔC_s	35
Figura 16 - Relação entre Tempo, agitação e ΔC_s	35
Figura 17 - Relação para equação de projeto do reator batelada do experimento 8.	37
Figura 18 – Vinho de morango.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação dos níveis.	22
Tabela 2 - Determinação dos experimentos.	23
Tabela 3 - Resultados dos experimentos.	27
Tabela 4 - Fatores de conversão.	36
Tabela 5 - Parâmetros da equação de projeto do reator batelada.	38
Tabela A 1 – Resultados do experimento 1.	44
Tabela A 2 - Resultados do experimento 2.	44
Tabela A 3 - Resultados do experimento 3.	44
Tabela A 4 - Resultados do experimento 4.	45
Tabela A 5 - Resultados do experimento 5.	45
Tabela A 6 - Resultados do experimento 6.	45
Tabela A 7 - Resultados do experimento 7.	46
Tabela A 8 - Resultados do experimento 8.	46
Tabela A 9 - Resultados do experimento 9.	46
Tabela A 10 - Resultados do experimento 10.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu_{\text{máx}}$: taxa específica máxima de crescimento (tempo^{-1});

μ_x : taxa específica de reprodução de microrganismos (tempo^{-1});

C_p : concentração de produto (massa/volume);

C_{p0} : concentração inicial de produto (massa/volume);

C_s : concentração de substrato (massa/volume);

C_{s0} : concentração inicial de substrato (massa/volume);

C_x : concentração de biomassa (massa/volume);

C_{x0} : concentração inicial de biomassa (massa/volume);

K_s : constante de saturação (massa/volume);

r_i : taxa instantânea do componente i ;

t : tempo de fermentação (tempo);

$Y_{i/j}$: fator de conversão que relaciona os valores de concentração de biomassa, substrato e produto.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 MATERIAL	21
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	21
4.3 MANUTENÇÃO DO KEFIR.....	23
4.4 ASSEPSIA DOS REATORES.....	23
4.5 PREPARO DO MOSTO	24
4.6 SÍNTESE DO VINHO DE MORANGO	24
4.7 CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.....	25
4.8 DENSIDADE E PH DA AMOSTRA	25
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KEFIR	26
4.10 OBTENÇÃO DO VINHO	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
6 CONCLUSÃO.....	39
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	40
8 REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE A.....	43

1 INTRODUÇÃO

O Brasil hoje é um dos maiores produtores de morango do mundo, sendo que os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais dominam a maior parte dessa produção. A região sul do estado de Minas Gerais é a maior área produtora do país, contando com cerca de 50% de todo o morango produzido, com mais de 4 mil produtores e uma produção de mais de 80 mil toneladas por ano (AYRES, 2015).

A área de plantio nacional compreende cerca de 1790 ha, e a cidade de Pouso Alegre – MG é a principal atuante, com uma área de plantio em torno de 400 ha. Esse fato faz com que a fruta seja um destaque nessa região, propiciando alta comercialização e alternativas variadas para seu uso (JORNAL EPTV, 2013).

Segundo Antunes (2011), o morango é denominado como pseudofruto, da família das rosáceas, a mesma que compreende as rosas, maçãs, peras e cerejas. É nativo de regiões de clima temperado da Europa e das Américas, sendo que o fruto propriamente dito, são as partículas amarronzadas que o circundam.

O morango é altamente perecível e muito sensível, fazendo com que a sua conservação após a colheita seja dificultada. Alternativas para essa situação são produções de geleias, sucos e doces no geral, que agregam valor ao produto e diminui o desperdício (ANDRADE *et al.*, 2013).

De acordo com Aquarone *et al.* (2001), vinho é uma bebida proveniente exclusivamente da fermentação alcoólica de uva. Já as bebidas alcoólicas obtidas a partir da fermentação de outras frutas devem, obrigatoriamente, serem rotulados com o nome de vinho, acompanhado do nome da fruta que lhe originou, como o vinho de morango.

O vinho de morango é obtido através da fermentação alcoólica dos açúcares presentes na fruta pela ação de leveduras e bactérias adicionadas. Os microrganismos necessitam de matéria orgânica para se reproduzirem e consomem, preferencialmente, carboidratos. A fermentação alcoólica ocorre por via anaeróbia e é um processo no qual os açúcares são convertidos em etanol e gás carbônico.

Para fermentação alcoólica também podem ser utilizados os grãos de kefir, que são massas gelatinosas que compreendem um conjunto microbiano, ou seja, composto por vários microrganismos, capaz de promover a fermentação. São compostos principalmente por *Lactobacillus*, com cerca de 65-80% da população microbiana total, além de *Lactococcus* e leveduras. A composição do kefir caracteriza-o como probiótico, que atua na regulação e equilíbrio da flora intestinal (MIGUEL, 2009). De acordo com Rodrigues (2005), algumas

propriedades como ação antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante, também são características dos grãos.

Para o estudo em questão, foi proposto a determinação de parâmetros cinéticos e operacionais na produção do vinho de morango, utilizando kefir como agente fermentador em um reator batelada, com o objetivo de encontrar valores adequados para a operação. Antes da etapa de realização dos experimentos, deve-se realizar um planejamento experimental, que consiste em uma ferramenta utilizada para determinar a quantidade de experimentos que devem ser realizados, otimizando tempo e possíveis gastos (Rodrigues, 2005).

O desenvolvimento desse trabalho possibilitou encontrar uma nova utilidade para o morango, evitando assim seu desperdício e agregando valor ao produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os parâmetros operacionais (tempo, temperatura e agitação) e determinar os parâmetros cinéticos da produção do vinho de morango, utilizando kefir como fermento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o planejamento experimental;
- Executar os experimentos;
- Tratar os dados obtidos;
- Utilizar o *software* Minitab 2019 (versão gratuita por 30 dias) para gerar as superfícies de resposta;
- Determinar os valores mais adequados de temperatura, tempo de fermentação e agitação para o processo em batelada;
- Determinar os parâmetros cinéticos da equação de Monod.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O morangueiro é uma planta rasteira, pertencente à família das Rosáceas. A parte vermelha da fruta é denominada pseudofruto, que é o morango propriamente dito. Essa denominação se deve ao fato de que os frutos estão relacionados com o ciclo reprodutivo das plantas, que nesse caso seriam os grãos amarronzados, chamados de aquênios. Já o pseudofruto é uma estrutura suculenta e saborosa, que é originada do receptáculo floral das plantas (ROCHA *et al.*, 2008).

O morango apresenta altas concentrações de vitamina C, quantidades significativas de vitaminas B1, B2, B3 e B6, além de outros nutrientes como cálcio, ferro, fósforo, potássio e magnésio, evidenciando-o como um alimento medicamentoso (MCIENTIFICA, 2019). Entre seus benefícios mais usuais e importantes estão o combate a infecções, ação antioxidante, ação diurética, atividade anti-inflamatória e prevenção de doenças cardiovasculares (ROCHA *et al.*, 2008).

A visibilidade do morango no Sul de Minas Gerais, sobretudo em Pouso Alegre, ocorre devido a sua produção em larga escala, e por ser uma fruta altamente perecível, fazendo com que os moradores e, principalmente, os produtores busquem alternativas para seu uso, evitando o desperdício e deixando de lucrar com o plantio (JORNAL EPTV, 2013). Uma de suas possíveis aplicações é na produção de vinho de morango, que se apresenta como um atrativo para produção em pequena escala e/ou artesanal. De acordo com Aquarone *et al.* (2001):

O vinho é um produto de transformação de matéria vegetal viva pelos microrganismos vivos. Dessa forma a sua composição, bem como sua evolução, são diretamente ligados aos fenômenos bioquímicos. Essa definição permite compreender a extrema complexidade de sua composição química e define ainda o valor alimentar do vinho: provinda de células vivas contém, em quantidade diluída, elementos necessários à vida.

A produção do vinho se dá através da fermentação alcoólica de leveduras e bactérias. A fermentação pode ser definida como um fenômeno natural em que matérias primas orgânicas mais complexas são transformadas em compostos mais simples, através da ação de fungos e/ou bactérias (DUARTE, 2014). Existem dois tipos de fermentação, a alcoólica e a acética, em que a primeira ocorre sem a presença de ar, denominada de anaeróbia, sendo essa, a de interesse para este trabalho.

O processo de fermentação consiste na transformação de açúcares em etanol e gás carbônico de acordo com a reação expressa pela equação I, representada de forma resumida (SOUSA, 2001).



Em que: $C_6H_{12}O_6$: glicose;
 C_2H_5OH : etanol;
 CO_2 : gás carbônico.

Diversos fatores podem influenciar na fermentação como a aeração, agitação, contaminações bacterianas, o pH em que se encontra, a temperatura, o tempo de fermentação e a concentração de açúcares e do fermento (SOUSA, 2001).

A aeração consiste em introduzir ar estéril ao mosto no início da fermentação, favorecendo o crescimento dos microrganismos e, conseqüentemente, a transformação completa dos açúcares. O oxigênio é fundamental para a multiplicação dos microrganismos, principalmente na fase inicial da fermentação, na qual ocorre a etapa de adaptação dos microrganismos ao meio onde foi adicionado. A aeração também proporciona a agitação do meio, minimizando a necessidade por agitação mecânica, sendo, por isso, de grande importância (SOUSA, 2001).

A agitação mecânica, quando bem realizada, promove a homogeneização dos nutrientes no meio, fazendo com que as amostras retiradas para análises, expressem a realidade dentro de qualquer ponto do interior do reator. Favorece também a troca térmica, facilitando o controle de temperatura. Além disso, promove a dispersão de metabólitos, favorecendo o processo, pois estes podem ser nocivos para o processo fermentativo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Durante as etapas de preparação para iniciar a fermentação, podem ocorrer contaminações por outras bactérias, que afetam direta e negativamente ao processo. As leveduras e bactérias competem com as bactérias contaminantes presentes, pelo substrato, comprometendo o rendimento do processo. Apesar de não ser algo comprovado, a contaminação bacteriana se apresenta como principal responsável pelos problemas ocorridos à fermentação alcoólica, sendo de suma importância o enfoque para condições ótimas de assepsia (STEINLE, 2013).

São as leveduras e bactérias que fazem o processo de fermentação ocorrer e, no presente trabalho, foi utilizado o kefir como agente fermentador. Segundo Rodrigues (2016) o significado da origem do nome kefir é “bem-estar”, e a bebida fermentada apresenta teor alcoólico, com características ácidas. As principais espécies encontradas no kefir são as bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconoctc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e leveduras do tipo *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Kasachstania*, *Lachancea* e *Yarrowia*, sendo que essa composição pode variar de acordo com a região onde é obtido (RODRIGUES, 2016).

Os grãos de kefir podem ser cultivados em leite ou em uma mistura de água com açúcar mascavo, em que este segundo foi o utilizado para produção do vinho de morango, proposta deste trabalho. O kefir é caracterizado como fonte de proteínas e cálcio e como probiótico, que auxilia no equilíbrio da flora intestinal, apresenta também alto valor nutritivo. Muito utilizado para o tratamento e prevenção de doenças devido a suas propriedades anti-inflamatória, capacidade de diminuir o colesterol e a pressão arterial, alta atividade antioxidante, capacidade de diminuir o crescimento tumoral, estimulador do sistema imune e anti-carcinogênico (RODRIGUES, 2016).

A cinética de fermentação dos grãos de kefir segue o modelo de Monod, de acordo com Demirhan (2015), que é representado pela equação II (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_S}{K_S + C_S} \quad (II)$$

Em que: μ_x : taxa específica de reprodução de microrganismos (tempo⁻¹);

$\mu_{m\acute{a}x}$: taxa específica máxima de crescimento (tempo⁻¹);

C_S : concentração de substrato (massa/volume);

K_S : constante de saturação (massa/volume).

Segundo Schmidell *et al.* (2001), esta equação é um dos modelos mais utilizados para explicar a relação entre a concentração de substrato e a taxa específica de crescimento do microrganismo. Com os dados obtidos experimentalmente é possível obter os parâmetros cinéticos da equação, pode ser analisado também a presença de inibidores, a influência da temperatura e do pH, sobre a amostra em análise.

A taxa instantânea de transformação (r_i) pode ser determinada pela equação III, que representa a reprodução do microrganismo, o consumo de substrato e formação de produto, para um tempo t (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$r_i = \frac{dC_i}{dt} \quad (\text{III})$$

Em que: C_i : concentração do componente i ;

i : pode representar a biomassa (X), o substrato (S) ou o produto (P).

A taxa específica é relacionada a concentração microbiana em um dado instante, conforme a equação IV.

$$\mu_i = \frac{1}{C_x} \frac{dC_i}{dt} \quad (\text{IV})$$

Os fatores de conversão, (Y_{ij}), são utilizados para relacionar os valores de C_x , C_p e C_s em um determinado tempo de fermentação, representados pelas equações V, VI e VII.

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{C_X - C_{Xo}}{C_{So} - C_S} \quad (\text{V})$$

$$Y_{\frac{X}{P}} = \frac{C_X - C_{Xo}}{C_P - C_{Po}} \quad (\text{VI})$$

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{C_P - C_{Po}}{C_{So} - C_S} \quad (\text{VII})$$

Em que: C_{xo} : concentração inicial de biomassa (massa/volume);

C_{po} : concentração inicial de produto (massa/volume);

C_{so} : concentração inicial de substrato (massa/volume).

A equação de taxa para a biomassa pode ser representada pela equação VIII.

$$r_x = \frac{\mu_{\max} C_s C_x}{K_s + C_s} \quad (\text{VIII})$$

A equação de projeto de um reator batelada para processo fermentativo, pode ser observada na equação IX, na sua forma já linearizada.

$$\frac{t}{\ln(C_x/C_{xo})} = \frac{M+1}{\mu_{\max}} - \frac{M}{\mu_{\max}} \cdot \frac{\ln(C_s/C_{so})}{\ln(C_x/C_{xo})} \quad (\text{IX})$$

$$M = \frac{K_s}{C_{so} + C_{xo} Y_{s/x}} \quad (\text{X})$$

Em que: t: tempo da fermentação (tempo);

$Y_{s/x}$: fator de conversão do substrato em relação a biomassa.

Outros parâmetros cinéticos como taxa instantânea de transformação, os fatores de conversão, coeficientes específicos de manutenção e o rendimento, também podem ser obtidos através dos experimentos a serem realizados (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A cinética do processo fermentativo é diretamente influenciada pelos valores de pH e temperatura. Por essa razão, a acidez deve ser mantida entre valores ideais para as leveduras/bactérias. Os microrganismos apresentam uma faixa de pH onde o crescimento e formação de produto ocorre em altas taxas. Bactérias apresentam valores de pH entre 4 e 8, as leveduras entre 3 e 6, mofos de 3 a 7 e células superiores entre 6,5 e 7,5. Sendo assim, é necessário encontrar um ponto ótimo para que somente os microrganismos de interesse possam crescer nesse meio, sem ação de contaminantes. Esse valor ótimo, para maioria dos microrganismos, encontra-se na faixa de pH de 5-6 (SOUSA, 2001; STEINLE, 2013).

A temperatura é uma das condições mais importantes, pois afeta diretamente a atividade metabólica dos microrganismos. Sousa (2001), afirma que as leveduras e bactérias funcionam bem numa faixa de temperatura entre 25 - 30° C, valores acima destes, favorecem o crescimento de outros microrganismos contaminantes, sendo desfavorável para o processo, e valores abaixo disso contribuem para diminuição da atividade enzimática.

É importante frisar a necessidade de manter constante a temperatura ao longo de todo o processo, pois variações podem acarretar em danos e perdas. Além disso, as temperaturas para

favorecer o crescimento microbiano e a formação de produto, podem não ser as mesmas, se analisadas separadamente (SOUSA, 2001).

A formação do produto ocorre por processos fermentativos, nos quais os açúcares são substratos. Quando não há inibição, uma maior concentração de substrato pode gerar uma maior taxa de fermentação. Porém, a alta concentração, pode causar perdas da atividade de transporte do açúcar, produzindo menos etanol. Dependendo dos valores de concentração e do meio, os açúcares atuam como inibidores sobre o metabolismo dos microrganismos. Em concentrações adequadas de açúcares, a taxa da reação aumenta e, conseqüentemente, a produtividade de etanol, favorecendo o desempenho do processo (STEINLE, 2013).

De acordo com Steinle (2013), altas concentrações de microrganismos aumentam a taxa da fermentação, aumentando também a temperatura e a produtividade, mas esse alto teor de microrganismos exige uma maior manutenção, sendo necessário uma quantidade de açúcares mais alta, para manter as células. Portanto, é necessário existir um valor ótimo que relacione a concentração do mosto com a concentração de microrganismos.

O tempo de fermentação é dependente da temperatura, pois quanto mais baixa a temperatura estiver, maior será o tempo necessário para finalizar o processo. Deve-se atentar ao fato de que, para o processo em batelada, quanto maior o tempo, maior será a redução da viabilidade celular. Os valores de concentração de substrato e de leveduras também influenciam diretamente no tempo (STEINLE, 2013).

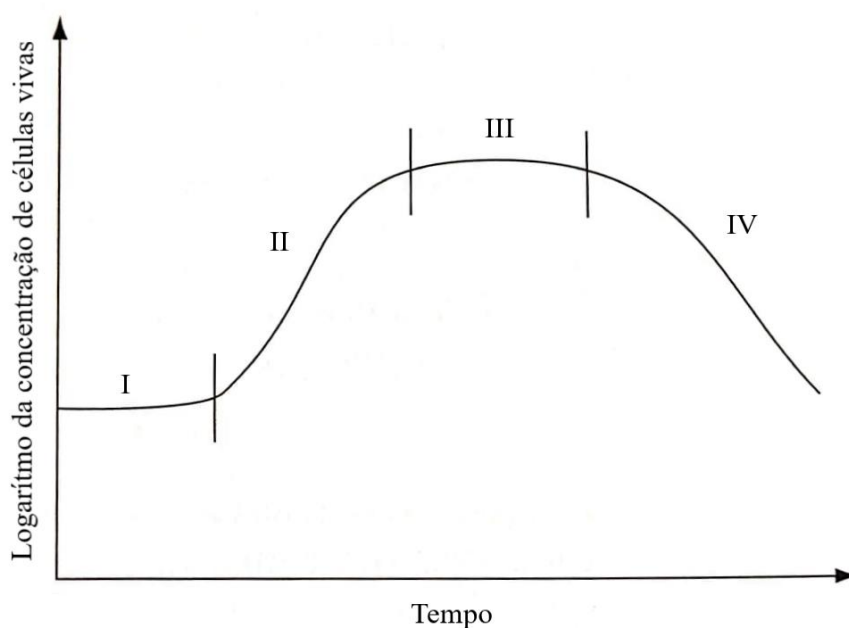
A fermentação pode ser realizada de várias formas, como por processo descontínuo, contínuo ou semicontínuo. Neste trabalho utilizou-se o processo em batelada, também conhecido como descontínuo, que consiste em inocular microrganismos em uma solução rica em nutrientes e esterilizada, para que se inicie o processo. Esse tipo de processo utiliza uma quantidade finita de material e durante o período da produção não tem adição e nem saída de componentes. O mosto estéril é adicionado a uma dorna, que pode ser um biorreator ou um fermentador, onde ocorre a fermentação (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O processo em batelada é considerado o mais seguro quanto a assepsia, devido ao fato de o reator manter-se vedado durante todo o processo, bem como pode ser esterilizado juntamente com o meio de cultura, diminuindo as chances de possíveis contaminações (PACHECO, 2010). Outro fator importante é que por conta do alto tempo de residência, reatores contínuos não seriam viáveis, pois teriam que apresentar grande volume, sendo mais adequado utilizar reatores em batelada. Além de que, o reator batelada utiliza menores quantidades de mosto, pois não é necessário fazer adição continuamente.

A adição dos microrganismos ao mosto é denominada de inoculação e, depois que isso ocorre, tem início o crescimento microbiano, que é dividido em 4 etapas. Em um processo em batelada, na etapa (I), denominada de fase “lag”, ocorre a adaptação dos microrganismos ao meio com os nutrientes e o crescimento microbiano é quase nulo. A fase (II) é conhecida como fase “log”, em que se observa a taxa de crescimento máxima. Os microrganismos encontram-se em sua plenitude e o suprimento de nutrientes é maior que as necessidades, é a fase mais importante (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Depois do alto crescimento microbiano, na etapa (III), a taxa vai diminuindo até que o número de novos microrganismos é igual ao número dos que morrem e já não há muitos nutrientes disponíveis. Por fim, ocorre a fase (IV), conhecida como fase de declínio, em que o número de microrganismos que morrem torna-se maior do que os que surgem, devido à escassez de nutrientes (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Na Figura 1 é apresentado uma curva de crescimento microbiano, demonstrando suas fases.

Figura 1 – Curva de crescimento microbiano em cultivo em batelada.



Fonte: Adaptada de FOGLER, 2014.

Depois de terminada a fermentação, o mosto fermentado é retirado da dorna e o fermentado segue para posterior tratamento se necessário, ou encontra-se pronto para uso. A dorna deve ser lavada e esterilizada ao final, para receber um novo meio de cultura.

Os fermentadores utilizados no presente trabalho, são os de escala laboratorial, que consistem em um recipiente de vidro, provido de agitação mecânica, com controle de temperatura.

Para dar início aos experimentos, é necessário que se realize um planejamento experimental, que consiste em realizar cálculos estatísticos para fornecer informações seguras sobre o processo, visando diminuir os possíveis erros, reduzir o número de experimentos e melhorar a qualidade dos resultados obtidos. Outro fator vantajoso desse planejamento é a diminuição do tempo gasto experimentalmente, pois é calculado a quantidade necessária de experimentos para obtenção de valores ideais, dentre as condições utilizadas (RODRIGUES, 2005). Esses cálculos são realizados com base na quantidade de variáveis desejadas a serem analisadas. Diante disso, utilizou-se o referencial apresentado como base para a realização do presente trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- Grãos de kefir;
- Açúcar mascavo;
- Três reatores, com capacidade de 1 L cada, que possuem controle de temperatura e agitação;

- Ácido peracético (10 mL/L);
- Banho ultratermostático Lucadema;
- Vinagre;
- Morangos;
- Açúcar cristal;
- Refratômetro Abbe Instrutherm RTA-100 com termômetro;
- Picnômetro;
- Balança analítica Weblaborsp M214Ai;
- Pipeta de 10 mL Uniglas;
- Pera de pipetagem;
- Pano esterilizado;
- Liquidificador Britania Diamante 800;
- 10 béqueres de 50 mL;
- Papel indicador de pH Macherey-Nagel;
- Kit de filtração a vácuo;
- Peneira.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Segundo Rodrigues (2005), o planejamento experimental funciona como uma ferramenta para determinar a quantidade de experimentos que devem ser realizados e quantificar, por meio de estudos estatísticos, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas. Para este trabalho foi proposto o uso do planejamento fatorial 2^k , em que k representa o número de fatores que se deseja controlar.

Tempo, temperatura e agitação foram as condições controladas durante o processo, obtendo assim um experimento fatorial de 2^3 , que resulta em 8 experimentos a serem realizados, intercalando os níveis, e mais 2 experimentos no ponto central, totalizando 10 experimentos.

Segundo Mayer (2017), os pontos centrais classificados como (0,0,0) são os valores intermediários entre os níveis escolhidos para cada parâmetro. Eles funcionam como uma forma de testar se existe curvatura na variável resposta, além de não interferir nas estimativas do planejamento de experimentos.

Antes de iniciar o planejamento, deve ser determinado os níveis para cada condição a ser controlada. Os níveis são os valores máximos e mínimos que cada condição pode operar. Para o tempo foi escolhido de 2 a 3 dias de fermentação, para a temperatura foi escolhido o intervalo entre 25 – 30° C e, para a agitação, foi determinado a rotação entre 25 – 65 rpm. Os níveis inferiores foram especificados como (-1), os níveis superiores como (+1) e a média desses valores é o ponto central, denominado como (0). Com isso, foi possível construir as Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Determinação dos níveis.

Parâmetros	(-1)	0	(+1)
Tempo (horas)	48	60	72
Temperatura (°C)	25	27,5	30
Agitação (rpm)	25	45	65

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Determinação dos experimentos.

Experimento	Tempo	Temperatura	Agitação
1	(-1)	(-1)	(-1)
2	(+1)	(-1)	(-1)
3	(-1)	(+1)	(-1)
4	(+1)	(+1)	(-1)
5	(-1)	(-1)	(+1)
6	(+1)	(-1)	(+1)
7	(-1)	(+1)	(+1)
8	(+1)	(+1)	(+1)
9	0	0	0
10	0	0	0

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 MANUTENÇÃO DO KEFIR

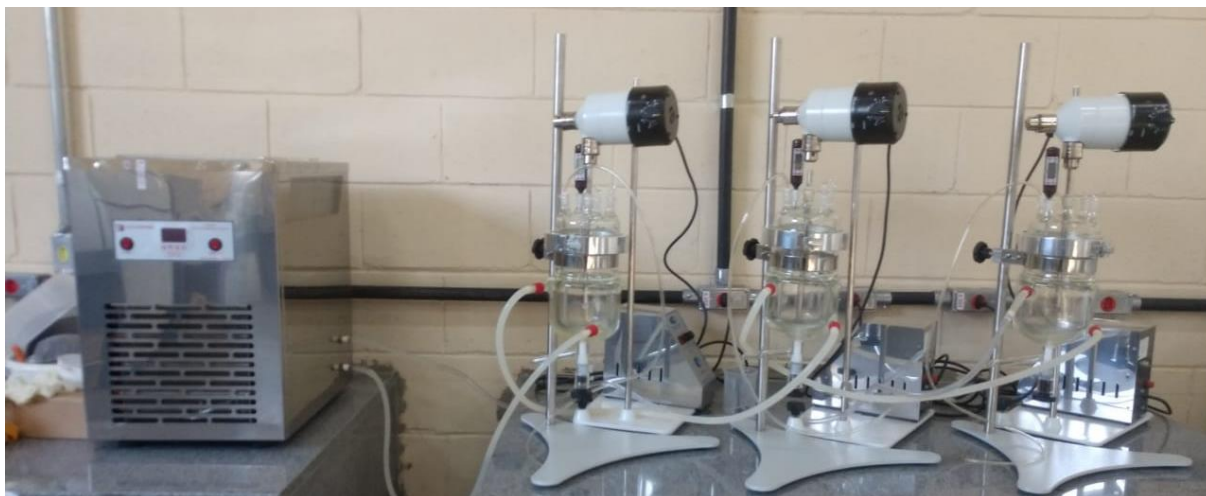
Os grãos de kefir foram mantidos em um recipiente de vidro com água potável e açúcar mascavo, em que, para cada 500 mL de água, era adicionado de 20 g de kefir (base úmida) e 50 g de açúcar mascavo. A cada semana, a água era trocada e fazia-se a lavagem dos grãos em água corrente potável.

4.4 ASSEPSIA DOS REATORES

Para realizar a limpeza dos reatores, foi adicionado 800 mL de uma solução de ácido peracético (10 mL/L). Depois de adicionar a solução, a temperatura foi mantida em torno de 50° C, através da camisa do reator, e a agitação foi acionada, mantendo-se nessas condições por 15 minutos.

Por fim, o reator foi lavado com água esterilizada, sendo mantido nas mesmas condições anteriormente citadas. Os reatores batelada utilizados são apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Reatores em batelada.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 PREPARO DO MOSTO

O preparo do mosto, consistiu em higienizar os morangos com água e vinagre, deixando-os imersos por 15 minutos. Após higienizados, foram triturados até que se obtivesse 300 mL da polpa da fruta. Em seguida era realizado a chaptalização, que consiste na adição de um xarope de açúcar, preparado com 100 g de açúcar e 50 mL de água, que foram aquecidos até que todo o açúcar tenha dissolvido. Por fim, o mosto obtido foi aquecido por 15 minutos, para esterilização, e filtrado com pano esterilizado.

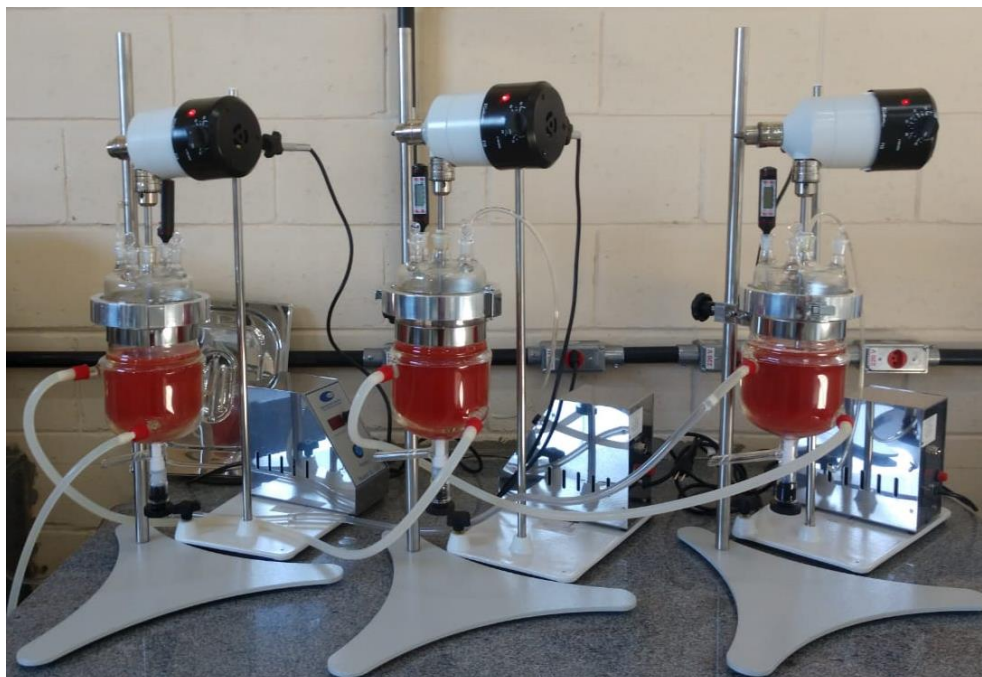
Uma amostra do mosto foi coletada antes de ser adicionado ao reator para que fossem realizadas as primeiras análises de temperatura, grau Brix, densidade e valor de pH. A cada 8 horas foram coletadas novas amostras para realizar as análises citadas, a coleta foi realizada com auxílio de uma pipeta de 10 mL e uma pera de pipetagem.

4.6 SÍNTESE DO VINHO DE MORANGO

Os grãos de kefir foram misturados em 650 mL de mosto, na proporção de 7% (m/v) (GAO, 2016), logo após, foram adicionados ao reator, que conta com um termopar digital, agitador e um mangueira para saída de gás carbônico (CO₂), produzido durante a fermentação. O comprimento da mangueira impede a contaminação do mosto com o meio exterior.

A Figura 3 ilustra os reatores prontos para dar início ao processo de fermentação.

Figura 3 - Reatores preenchidos com o mosto e os grãos de kefir.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Para análise da concentração de substrato foi utilizado o refratômetro Abbe, que mede o índice de refração de líquidos quando a luz passa de um meio a outro. Esse tipo de dispositivo faz uso do princípio do ângulo de reflexão total, possibilitando a análise das propriedades ópticas do material, com isso, é possível identificar determinadas características do material em análise (PROLAB, 2019).

Uma das características determinadas, utilizando o refratômetro, é o grau Brix ($^{\circ}\text{Bx}$), que mede a quantidade de sólidos solúveis presente na amostra, no caso a quantidade de açúcar. Quanto maior o valor do grau Brix, maior a quantidade de açúcar. Com isso, é possível determinar a concentração de açúcar presente, pois 1°Bx é igual a 1 g de açúcar por 100 g de solução (APPC, 2019).

4.8 DENSIDADE E pH DA AMOSTRA

Para determinação da densidade, a técnica utilizada foi a picnometria. O picnômetro é uma vidraria especial que possui baixo coeficiente de dilatação e a água em temperatura

ambiente é usada como substância padrão para determinar o volume exato da vidraria. Com o volume especificado, é possível determinar a densidade, pesando a amostra.

O valor de pH foi medido usando papel indicador, que apresenta uma determinada cor para cada valor de pH variando de 0 a 14.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE KEFIR

A concentração de kefir foi determinada em base úmida, realizada antes de ser adicionado ao reator e no final da fermentação. A determinação da concentração de kefir em função do tempo não seria viável, pois o reator precisaria ser aberto, interferindo na reação.

Para obter os valores aproximados da concentração de kefir em função do tempo, utilizou-se a equação (V), com base nos valores inicial e final da concentração de substrato, no valor do fator de conversão e na concentração inicial de kefir.

4.10 OBTENÇÃO DO VINHO

A final do processo fermentativo, o vinho foi retirado do reator, filtrado em uma peneira para retirar os grãos de kefir e realizou-se a filtração a vácuo, utilizando um kitassato, funil, bomba de vácuo e um pano esterilizado, para obter o vinho de morango límpido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizados os experimentos apresentados na Tabela 2. Os resultados obtidos para cada um deles, são apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 4 a 13. Os dados coletados durante os experimentos estão apresentados nas tabelas do APÊNDICE A.

Todos os experimentos realizados mantiveram o valor de pH entre 3 e 4 durante todo o tempo de fermentação, exceto para os dois pontos iniciais dos experimentos 3, 7 e 8. Essa constância do valor de pH se deu sem adição de agentes controladores (ácido ou base), verificando-se que durante a síntese do vinho de morango o pH não interferiu nos resultados.

A temperatura ao longo dos experimentos não se manteve constante, devido a alterações das condições climáticas na temperatura ambiente, em que o banho ultratermostático dos reatores não conseguiu suprir essa alteração. Por isso, os resultados apresentados são para as temperaturas obtidas experimentalmente a cada coleta das amostras, sendo alguns diferentes dos valores estipulados no planejamento experimental. Esses dados são apresentados nas tabelas do APÊNDICE A.

Tabela 3 - Resultados dos experimentos.

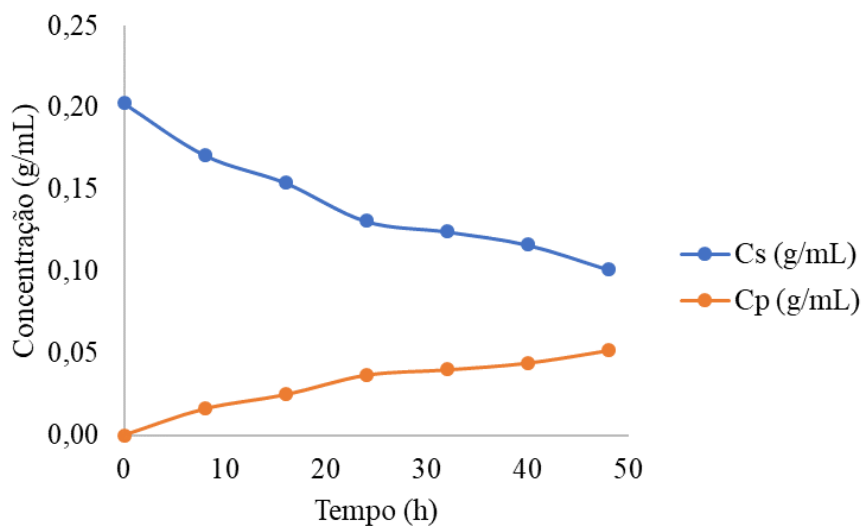
Experimentos	Condições	C _{so} (g/mL)	C _s (g/mL)	C _x (g/mL)	C _p (g/mL)	Teor alcoólico (% v/v)
1	48h; 25° C; 25 rpm	0,2027	0,1013	0,1580	0,0519	6,5769
2	72 h; 25° C; 25 rpm	0,2054	0,1061	0,1528	0,0512	6,4840
3	48 h; 30° C; 25 rpm	0,2056	0,1118	0,1424	0,0479	6,0768
4	72 h; 30° C; 25 rpm	0,2027	0,0956	0,1223	0,0548	6,9444
5	48 h; 25° C; 65 rpm	0,2061	0,1176	0,1433	0,0453	5,7410
6	72 h; 25° C; 65 rpm	0,2027	0,1056	0,1459	0,0497	6,2974
7	48 h; 30° C; 65 rpm	0,2090	0,1172	0,1306	0,0469	5,9499
8	72 h; 30° C; 65 rpm	0,2054	0,0973	0,0955	0,0552	7,0015
9	60 h; 27,5° C; 45 rpm	0,2054	0,1050	0,1073	0,0513	6,5064
10	60 h; 27,5° C; 45 rpm	0,2061	0,1187	0,1228	0,0447	5,6649

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas Figuras 4 a 13 são apresentados os perfis de C_s e C_p durante o tempo de fermentação.

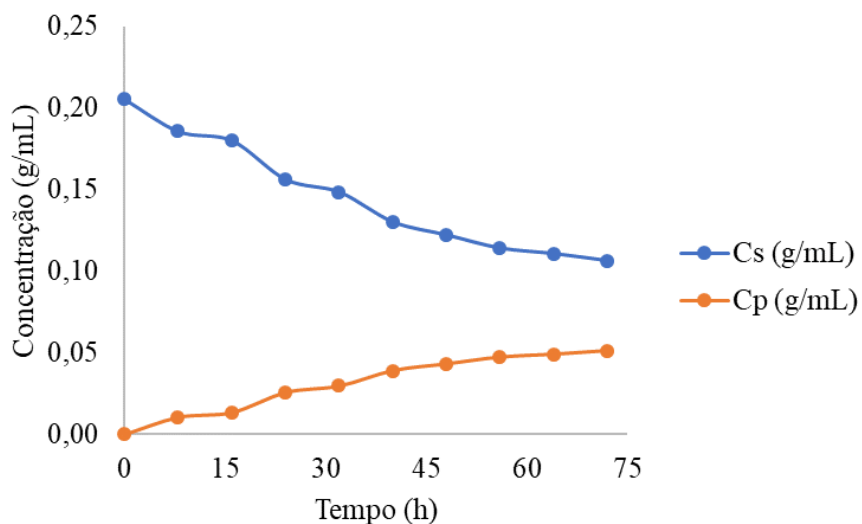
Para os experimentos 1 e 2 (Figuras 4 e 5, respectivamente), o tempo é a condição que os diferencia, em que o experimento 1 foi analisado por um período de 48 horas e o experimento 2 por 72 horas.

Figura 4 - Análise da concentração com o tempo do experimento 1.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 - Análise da concentração com o tempo do experimento 2.



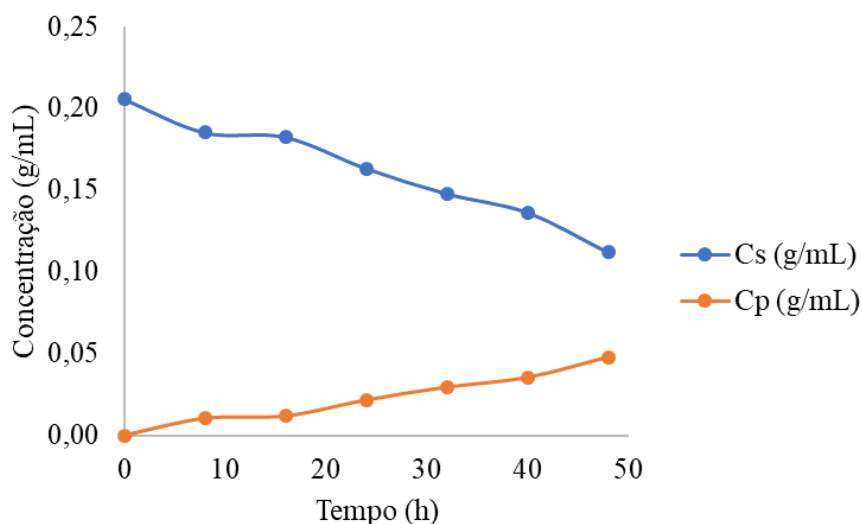
Fonte: Elaborada pela autora.

Nos dois experimentos os dados estão de acordo com a literatura, ocorrendo formação do álcool etílico como produto do processo de fermentação. É possível observar uma pequena

diferença na tendência dos gráficos. No experimento 1, a curva de C_s se apresenta de forma mais linear, demonstrando que a fase de adaptação ao meio (fase “lag”), caracterizada por um menor consumo de substrato (SCHMIDELL *et al.*, 2001), pode ser desconsiderada. Para o experimento 2, os últimos resultados obtidos tendem a ser constantes quando comparados ao experimento 1, o que indica que o processo fermentativo estava próximo de ser interrompido devido à presença do etanol no meio. Mesmo com a diferença no tempo de fermentação, os dois experimentos apresentaram valores próximos tanto para C_s quanto para C_p .

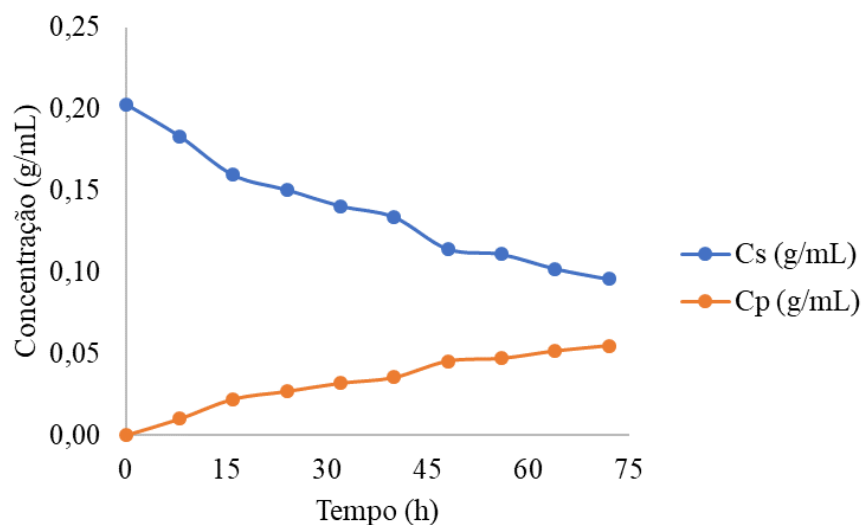
Nas Figuras 6 e 7, são apresentados os experimentos 3 e 4. A diferença entre eles é o tempo de fermentação, sendo que o experimento 4 ficou por um período de 24h a mais que o 3. Como é possível observar nos tempos iniciais, para o experimento 4, o declínio de C_s foi mais acentuado e, no fim da fermentação, este apresenta valores maiores para C_p , quando comparado ao valor do experimento 3. Sendo assim, o maior tempo de fermentação influenciou diretamente na maior formação de produto.

Figura 6 - Análise da concentração com o tempo do experimento 3.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 - Análise da concentração com o tempo do experimento 4.

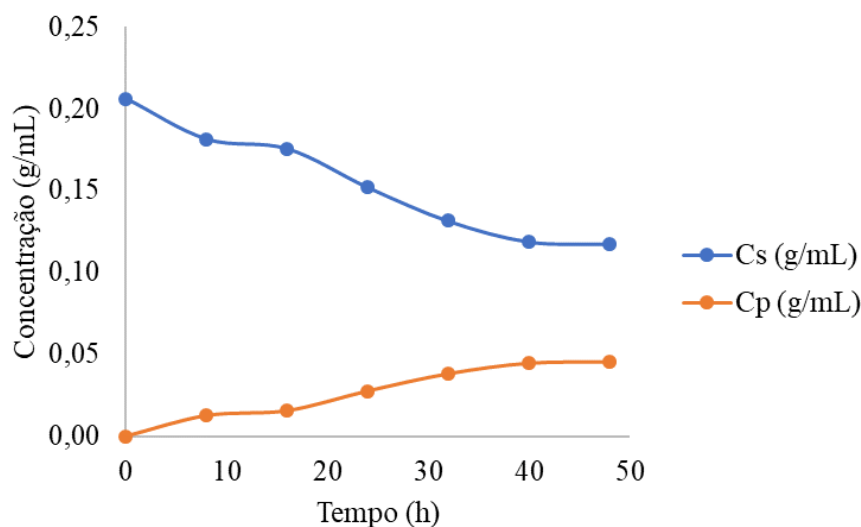


Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos 3 e 4 foram conduzidos a uma temperatura de 30° C (5° C a mais que os experimentos 1 e 2) e observou-se que a maior temperatura influenciou em tempos mais longos de fermentação, por isso, o experimento 4 apresentou maior teor alcoólico.

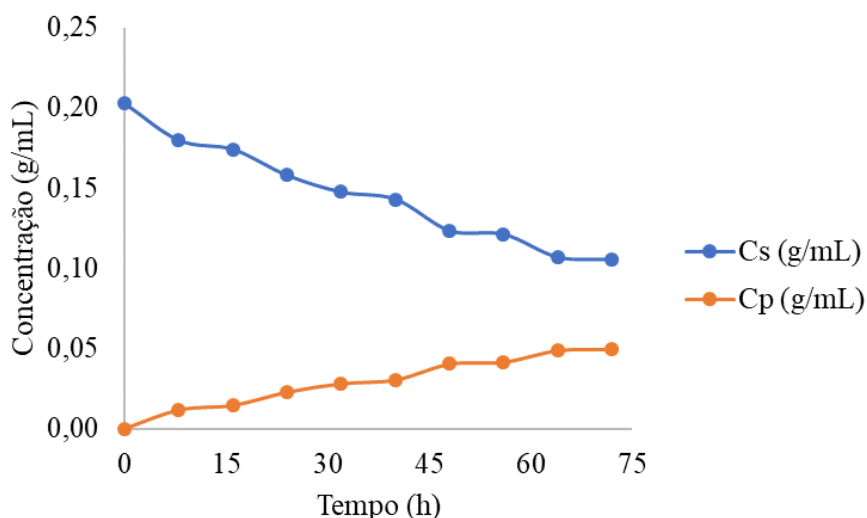
Os perfis de concentração para os experimentos 5 e 6 são apresentados nas Figuras 8 e 9, em que o parâmetro que os diferencia também é o tempo, sendo que para o experimento 6, o tempo de fermentação é 24h maior.

Figura 8 - Análise da concentração com o tempo do experimento 5.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Análise da concentração com o tempo do experimento 6.



Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar que no experimento 5 leva-se um maior tempo para dar início ao declínio de C_s que para o experimento 6, que neste, ocorre de maneira mais rápida.

O valor final de C_p para o experimento 6 é maior que para o 5, podendo afirmar que o tempo, neste caso, também influenciou de maneira positiva para o processo de fermentação.

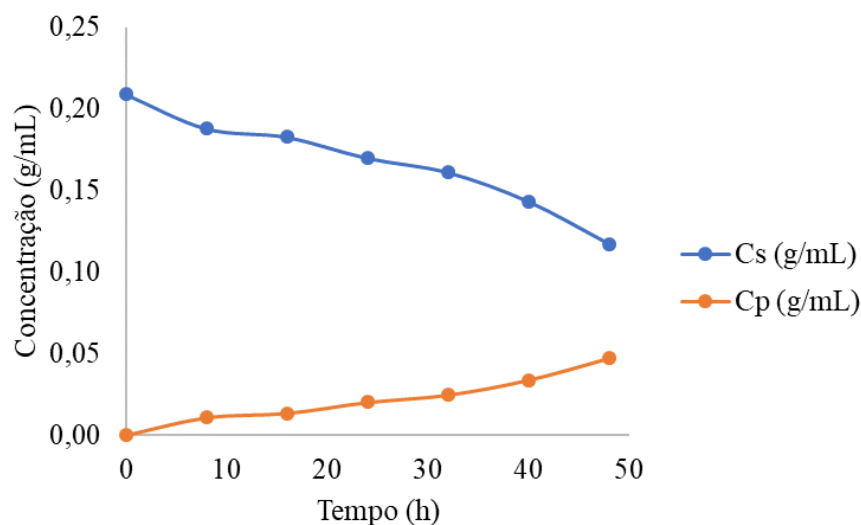
Os experimentos 5 e 6 se diferenciam dos experimentos 1 e 2, respectivamente, pela intensidade da agitação, pois foram conduzidos a 65 rpm, enquanto que os experimentos 1 e 2 foram conduzidos a 25 rpm. Observa-se que a 65 rpm foi obtido um vinho de morango com menor teor alcoólico, que pode ser explicado pela sensibilidade dos microrganismos às forças de cisalhamento, diminuindo sua atividade nessas condições.

Nos experimentos 7 e 8, comportamento representado nas Figuras 10 e 11, o tempo de fermentação foi o parâmetro diferente entre eles. O experimento 7, com menor tempo de fermentação, apresentou bons resultados, em que a fase “lag” é quase imperceptível. Para o experimento 8 a fase “lag” pode ser desconsiderada, pois apresenta um comportamento linear desde o início do experimento.

O decaimento mais brusco no valor de C_s observado no experimento 8, entre os tempos de 40 e 48 horas, se deve ao fato de que houve um aumento da temperatura ambiente, dificultando o efetivo controle de temperatura do banho ultratermostático.

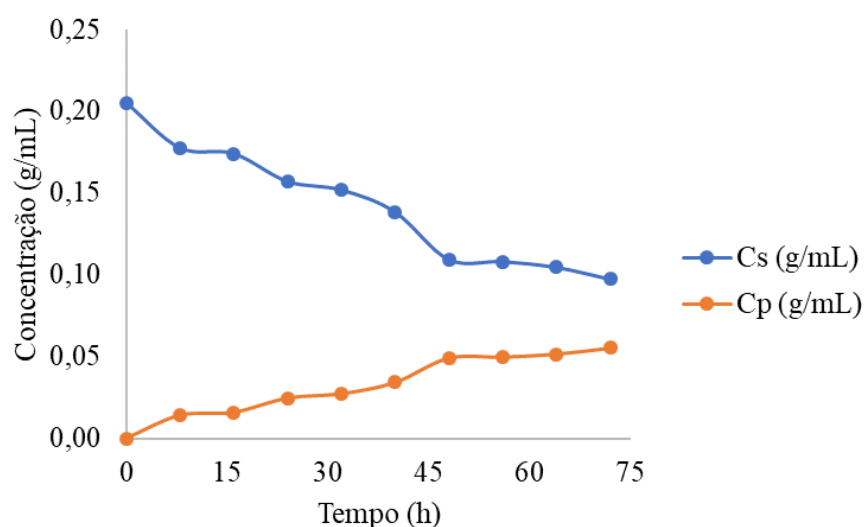
O valor final de C_p do experimento 8 é elevado quando comparado ao do experimento 7, concordando com os outros experimentos, em que o maior tempo de fermentação influenciou diretamente nos resultados obtidos.

Figura 10 - Análise da concentração com o tempo do experimento 7.



Fonte: Elaborada pela autora.

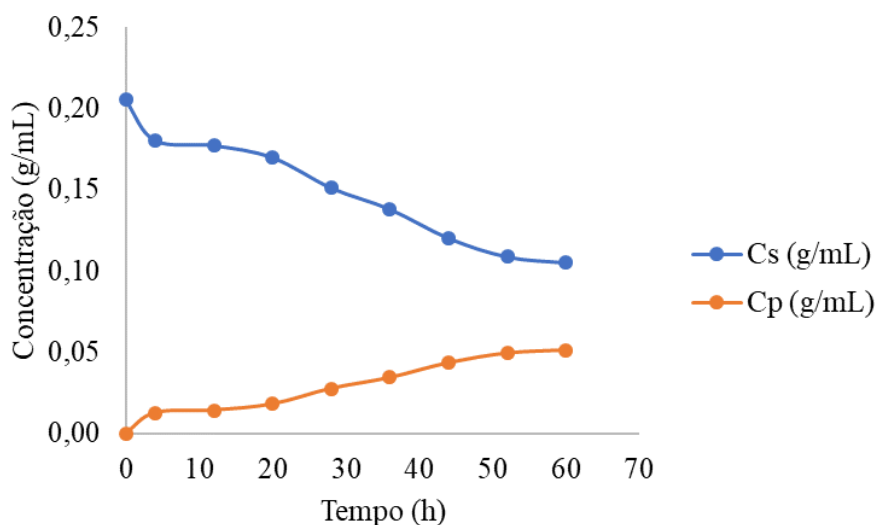
Figura 11 - Análise da concentração com o tempo do experimento 8.



Fonte: Elaborada pela autora.

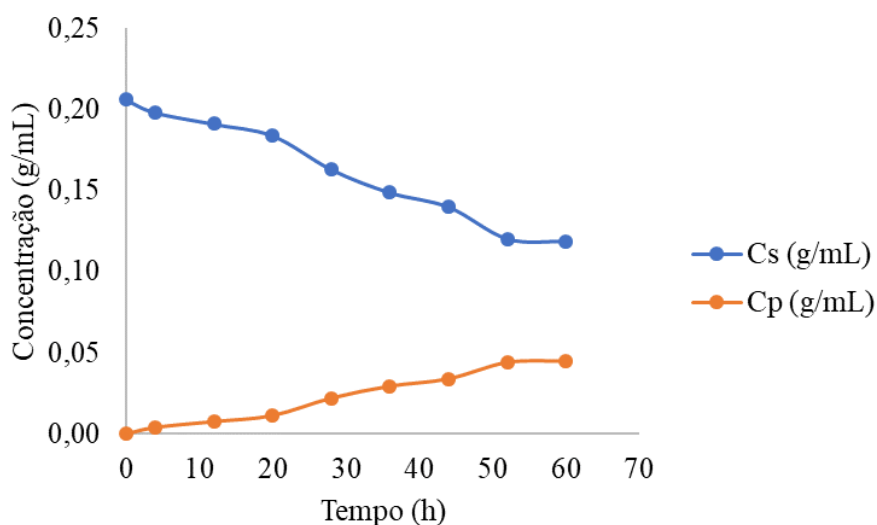
Os experimentos 9 e 10, representados nas Figuras 12 e 13, foram realizados nas mesmas condições (pontos centrais do planejamento fatorial) e os gráficos apresentaram a mesma tendência. A fase “lag” pode ser observada no início do experimento. No final, pode-se perceber uma tendência para as concentrações ficarem constantes. Há uma pequena variação dos resultados obtidos, pois o controle de temperatura nos diferentes reatores não se deu de forma igualitária.

Figura 12 - Análise da concentração com o tempo do experimento 9.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Análise da concentração com o tempo do experimento 10.



Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a influência dos três parâmetros sobre o processo de fermentação, o 8º apresentou os melhores resultados, por exibir o menor valor de C_s no final do processo. O experimento 4 também apresentou bons valores como resposta, com baixo valor de C_s no final e alto valor de C_p . Todos os experimentos se mostraram efetivos, pois apresentaram as características esperadas para o vinho de morango, variando a concentração de glicose e álcool etílico de um experimento para o outro.

Posteriormente, com auxílio do *software* Minitab, foram geradas superfícies de resposta para analisar o melhor experimento em função da variação do tempo, temperatura e agitação. Para isso foram criados três gráficos como resposta, em que, nos eixos “x” e “y”, intercalaram-se os valores de tempo, temperatura e agitação e, no eixo “z”, foi colocado os valores da variável resposta, o valor de ΔC_s de cada experimento, que é calculado de acordo com a equação XI.

O valor de ΔC_s foi escolhido como variável resposta pois quanto maior sua variação, maior a quantidade de substrato que se transformou em produto e, conseqüentemente, maior o teor alcoólico.

$$\Delta C_s = C_{so} - C_{sf} \quad (XI)$$

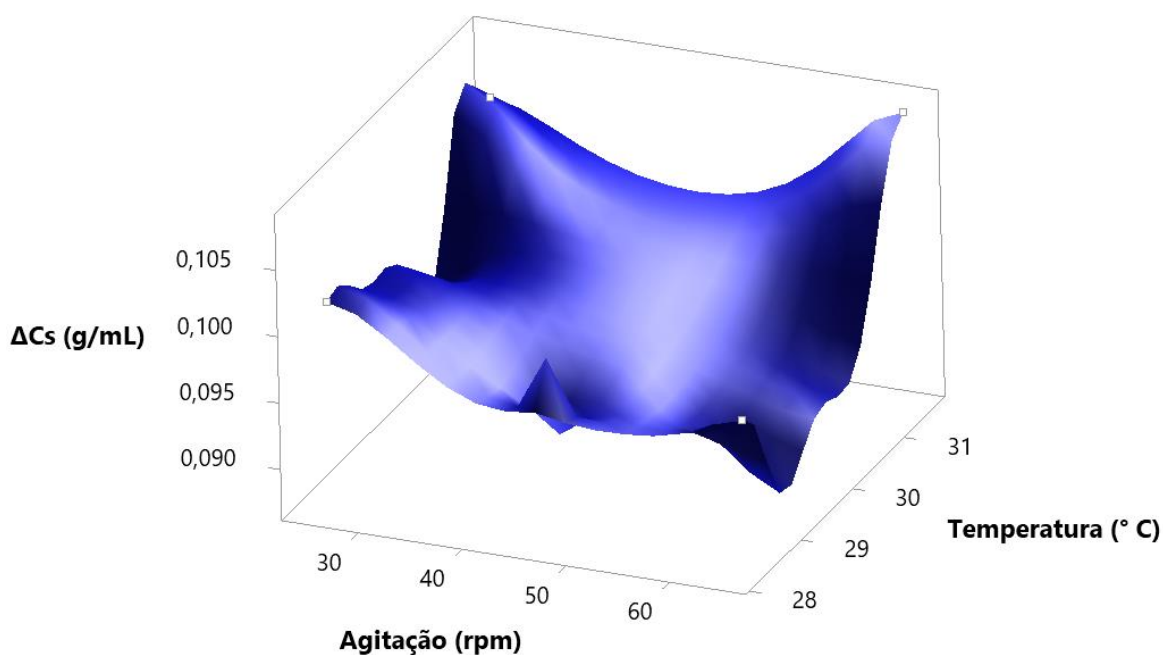
Em que: ΔC_s é a diferença entre a concentração de substrato;

C_{sf} : concentração de substrato final.

Para obter os valores de temperatura, foi realizado uma média dos pontos coletados para cada experimento e, esse valor médio, foi utilizado para gerar as superfícies respostas.

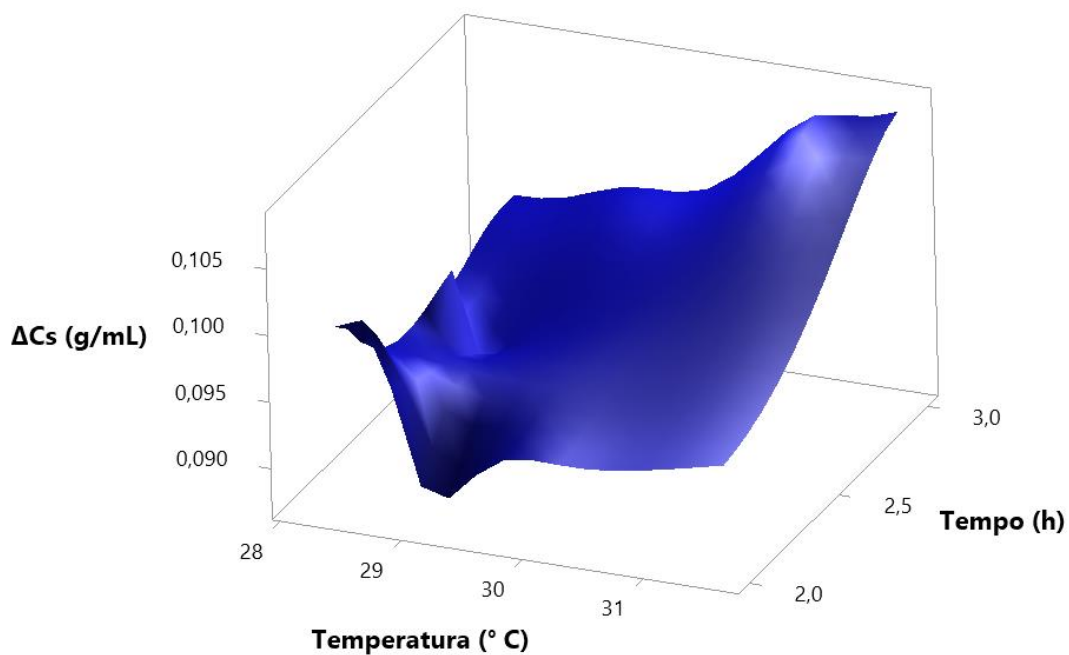
As superfícies obtidas são apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16.

Figura 14 - Relação entre temperatura, agitação e ΔC_s .



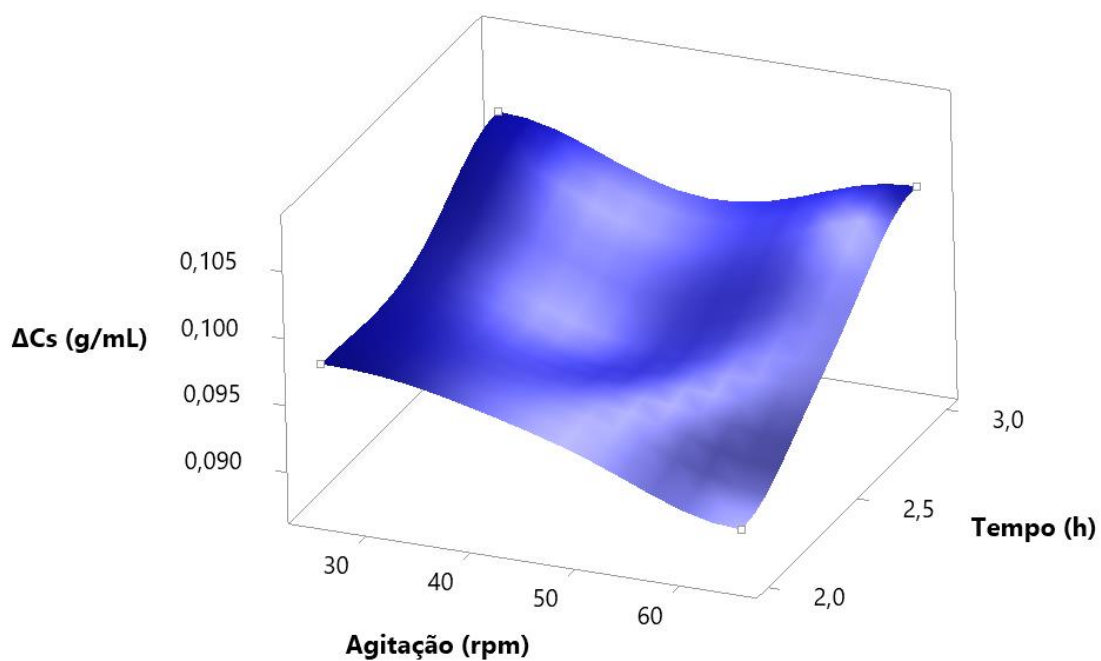
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Relação entre temperatura, tempo e ΔC_s .



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - Relação entre tempo, agitação e ΔC_s .



Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nas superfícies geradas pode-se inferir que a combinação de maiores valores de tempo, temperatura e agitação acarreta em maiores valores de ΔC_s , em que para as três

superfícies, o melhor resultado se dá para o tempo de 3 dias, a temperatura de 30° C e a agitação de 65 rpm, que correspondem ao experimento 8.

Para as Figuras 14 e 15, é possível observar que os valores inconstantes da temperatura, interfere no comportamento do gráfico, apresentando diversas variações ao longo do tempo e com diferentes agitações. Nesses casos o ponto mais alto dos gráficos pode ser observado para o experimento 8, apresentando a maior conversão. Para a Figura 14, para o experimento 4, de maior temperatura e menor agitação (25 rpm), também apresentou bons resultados, pois o seu valor de ΔC_s é muito próximo ao do experimento 8.

A variação da agitação com o tempo, apresentado na Figura 16, apresenta um comportamento mais uniforme quando comparado aos demais. Os melhores resultados obtidos são para os experimentos 4 e 8 novamente, sendo que o 8 obteve o maior valor. Para alguns pontos em que a agitação se manteve no maior valor estipulado (65 rpm), os resultados apresentaram os menores valores para C_s , isso pode ser explicado pelo fato dos microrganismos serem sensíveis a agitação, diminuindo sua produtividade.

Foram calculados também os fatores de conversão apresentados nas equações V, VI e VII, que relacionam os valores de concentrações inicial e final de cada componente, para o experimento 8. Na Tabela 4 são apresentados os valores de cada fator.

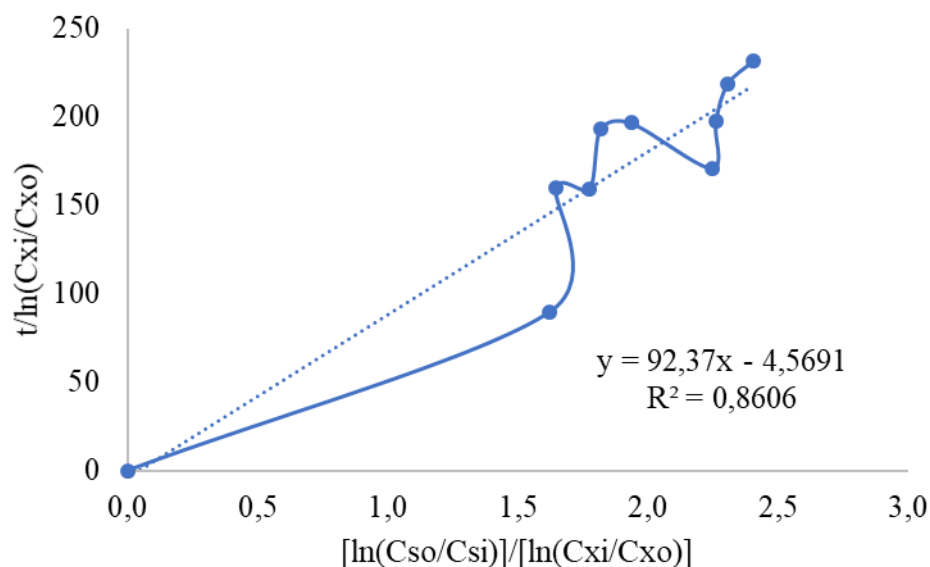
Tabela 4 - Fatores de conversão.

$Y_{x/s}$	$Y_{x/p}$	$Y_{p/s}$
0,2361	0,4616	0,5114

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foram calculados os coeficientes angular e linear da equação do reator batelada (Equação IX) e construiu-se um gráfico para o experimento 8 apresentado na Figura 17, para determinação dos parâmetros do modelo cinético de Monod.

Figura 17 - Relação para equação de projeto do reator batelada do experimento 8.



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que os valores obtidos não seguem o padrão linear desejado, isto pode ter ocorrido devido a deficiência do banho ultratermostático em realizar o controle efetivo da temperatura ao longo do experimento, uma vez que a temperatura ambiente no laboratório estava elevada, acarretando em pequenas variações. Porém, o ajuste apresentou um valor de coeficiente de correlação de 0,8606, mostrando-se adequado do ponto de vista matemático, levando em conta que experimentos laboratoriais estão sujeitos a influência de fatores adversos, como o controle de temperatura e as análises das amostras.

Segundo Demirhan (2015), para que o ajuste represente os dados de maneira satisfatória, o valor do coeficiente de correlação deve ser maior que 0,95. Sendo assim, os experimentos poderiam ser refeitos, com um maior controle dos parâmetros operacionais e com maior quantidade de fatores escolhidos para o planejamento experimental, além do tempo, temperatura e agitação, visando a obtenção de um maior coeficiente de correlação, demonstrando que os grãos de kefir seguem o modelo de Monod.

De posse da equação gerada pelo gráfico, calculou-se os valores de $\mu_{\max}$, M e K_s de acordo com as equações IX e X. Os valores obtidos para os parâmetros das equações são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros da equação de projeto do reator batelada.

$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	M	Ks (g/mL)
0,0103	0,9529	0,4782

Fonte: Elaborada pela autora.

Na equação XII é representada a expressão cinética da equação de Monod para o processo de obtenção do vinho de morango utilizando como fermento os grãos de kefir, realizado nas condições do experimento 8.

$$\mu_x = \frac{0,0103 \cdot C_s}{0,4782 + C_s} \quad (\text{XII})$$

Na Figura 18 é apresentado o vinho de morango obtido.

Figura 18 – Vinho de morango.



Fonte: Elaborada pela autora.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram realizados experimentos para a produção do vinho de morango utilizando o kefir como agente fermentador. As condições analisadas foram tempo, temperatura e agitação. Os valores de pH se mantiveram constantes durante os experimentos, fazendo com que este parâmetro não fosse analisado ponto a ponto.

O estudo desenvolvido se mostrou eficiente, seguindo o padrão predito pela literatura, onde a concentração de produto aumentou com o tempo. Pôde-se observar que as condições analisadas são diretamente proporcionais aos valores de C_p , pois quanto maior a temperatura, tempo e agitação, maior foi a quantidade de produto formado.

O vinho de morango obtido apresentou uma tendência semelhante ao modelo previsto por Monod, mas uma análise mais detalhada poderia ser realizada para obtenção de dados com coeficientes de correlação mais próximos dos apresentados na literatura. Este se apresentou com cor e sabor agradáveis, com bons resultados para o teor alcoólico.

A realização do planejamento experimental foi determinante na obtenção de resultados precisos, pois este estudo estatístico resultou em um número de experimentos a serem realizados, determinando quais as condições de cada um deles, otimizando o tempo de realização e diminuindo gastos excessivos com matéria-prima e energia.

O *software* Minitab auxiliou na obtenção das superfícies de resposta, fornecendo o comportamento dos experimentos em relação aos parâmetros operacionais, mostrando-se uma excelente ferramenta para tratamento dos dados de forma didática e precisa.

A dificuldade do controle de temperatura acarretou em alterações em alguns pontos durante os experimentos. Em função do clima local, o banho termostático teve dificuldades em manter a temperatura da camisa constante, o que gerou variações no comportamento dos microrganismos, causando modificações nos resultados.

Analisando o conjunto de dados obtidos, pode-se concluir que o experimento 8, que possui os maiores valores para temperatura, tempo e agitação, apresentou a maior conversão de substrato em produto, indicando que os microrganismos do kefir se adaptaram melhor a essas condições e, por isso, foi considerado o melhor resultado para este trabalho.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fazer análise da melhor concentração para o morango;
- Fazer análise sensorial para o produto obtido;
- Identificar se o álcool afeta as propriedades do kefir;
- Analisar se o vinho é seco, suave ou doce;
- Identificar possíveis propriedades medicinais do vinho;
- Utilizar um agente conservante na fabricação do vinho;
- Tentar manter a temperatura constante.

8 REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. B. *et al.* *Caracterização do vinho de morango no processo de fermentação alcoólica*. VII Encontro Internacional de Produção Científica (EPCC) – Centro Universitário Cesumar, Maringá – PR, Brasil, 22 out. 2013.

ANTUNES, L.; CARVALHO, G.; SANTOS, A. *Plantar morango*. 2ª Ed. Brasília - DF, Brasil: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

APPC. *O que é grau Brix?*. Disponível em: <<http://appc.coop.br/o-que-e-grau-brix/>>. Acesso em: 23 out. 2019.

AQUARONE, E. *et al.* *Biotecnologia Industrial*. 1ª Ed. Vol. 4. São Paulo - SP, Brasil: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

AYRES, D. *Morango é tema de encontro nacional sobre produção no sul de Minas*. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/noticia/2015/08/morango-e-tema-de-encontro-nacional-sobre-producao-no-sul-de-minas.html>>. Acesso em 04 abr. 2019.

BORZANI, W. *et al.* *Biotecnologia Industrial*. 1ª Ed. Vol. 1. São Paulo - SP, Brasil: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

DEMIRHAN, E. *et al.* Kefir grain biomass production: influence of different culturing conditions and examination of growth kinetic models. *Journal of Food Engineering*. Istanbul. 24 nov. 2015.

DUARTE, F. T. B. *A fermentação alcoólica como estratégia no ensino de transformação química no nível médio em uma perspectiva interdisciplinar*. 192f. Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil, 25 nov. 2014.

FOGLER, H. S. *Cálculo de reatores: o essencial da engenharia das reações químicas*. Tradução e revisão técnica de Flávio Faria de Moraes. 1ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014.

GAO, X; LI. B. *Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review*. Department of Health and Safety, Shanghai Urban Construction Vocational College, Shanghai, P.R., China, 26 dez. 2016.

JORNAL EPTV. *Produção de morangos no Sul de Minas já é a maior do Brasil*. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/jornal-da-eptv-2edicao/videos/v/producao-de-morangos-no-sul-de-minas-ja-e-a-maior-do-brasil/2642026/>>. Acesso em 04 abr. 2019.

MAYER, F. P. *Controle de processos industriais*. Curso Estatística – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil, 2017. Disponível em: <http://leg.ufpr.br/~fernandomayer/aulas/ce074/fatorial_pontos-centrais.html>. Acesso em 10 set. 2019.

MCIENTIFICA. *Frutas de A a Z*. Disponível em: <<http://www.blog.mcientifica.com.br/wp-content/uploads/2013/07/Frutas-de-A-a-Z.pdf>>. Acesso em 17 mai. 2019.

MIGUEL, M.G.C.P. *Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades*. 84f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, Brasil, 2009.

PACHECO, T. F. *Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente*. 107f. Programa de Pós-Graduação – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil, 2010.

PROLAB. *Refratometria*. Disponível em: <<https://www.prolab.com.br/blog/equipamentos-aplicacoes/refratometria-entenda-o-que-e-refratometro-e-sua-utilizacao-em-alimentos/>>. Acesso em 23 out.2019.

ROCHA, D. A. *et al. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras – MG*. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, Brasil. Vol. 30, No. 4, p. 1124-1128. Dez., 2008.

RODRIGUES, K. L. *Propriedades anti-inflamatória e antiulcerogênica de uma cerveja fermentada unicamente por grãos de quefir*. 88f. Dissertação de doutorado – Universidade Federal de Alfenas – Alfenas – MG, Brasil, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamento*. 1ª Ed. Campinas - SP, Brasil: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*, Alfenas - MG, Brasil. Vol. 13, No. 5–6, pp. 485–492, 2005.

SCHMIDELL, W. *et al.* *Biotecnologia Industrial*. 1ª Ed. Vol. 2. São Paulo - SP, Brasil: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

SOUSA, J.L.U., MONTEIRO, R.A.B. *Fatores que interferem na fermentação alcoólica para produção de etanol*. FAZU em Revista, Uberaba – MG, Brasil. No. 8, p. 100-107, 2001.

STEINLE, L. A. *Fatores que interferem na fermentação alcoólica*. 58f. Pós-Graduação – Universidade Federal de São Carlos – Sertãozinho – SP, Brasil, 2013.

APÊNDICE A

Nas Tabelas A1 a A10 são apresentados os resultados coletados ponto a ponto durante a realização dos experimentos.

Tabela A 1 – Resultados do experimento 1.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	28,6	18,5	3,5	1,0958	0,2027	0,0000	0,0000
8	25,0	15,7	3,5	1,0894	0,1710	0,0162	2,0546
16	32,5	14,2	3,5	1,0859	0,1542	0,0248	3,1462
24	30,0	12,3	3,5	1,0633	0,1308	0,0368	4,6631
32	25,0	11,8	3,5	1,0537	0,1243	0,0401	5,0812
40	30,0	11,1	3,5	1,0481	0,1163	0,0442	5,5995
48	29,0	9,7	3,5	1,0440	0,1013	0,0519	6,5769

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 2 - Resultados do experimento 2.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	28,0	18,5	3,5	1,1102	0,2054	0,0000	0,0000
8	29,0	16,8	3,5	1,1050	0,1856	0,0105	1,3284
16	27,5	16,3	3,5	1,1039	0,1799	0,0134	1,6979
24	32,0	14,4	3,5	1,0839	0,1561	0,0256	3,2441
32	31,0	13,9	3,5	1,0671	0,1483	0,0296	3,7467
40	28,5	12,2	3,5	1,0650	0,1299	0,0390	4,9390
48	32,5	11,5	3,5	1,0603	0,1219	0,0431	5,4579
56	29,0	10,8	3,5	1,0541	0,1138	0,0472	5,9821
64	27,0	10,5	3,5	1,0518	0,1104	0,0489	6,2031
72	31,0	10,2	3,5	1,0402	0,1061	0,0512	6,4840

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 3 - Resultados do experimento 3.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	29,0	18,5	3,0	1,1113	0,2056	0,0000	0,0000
8	31,0	16,8	3,0	1,1023	0,1852	0,0104	1,3235
16	29,0	16,6	3,5	1,0989	0,1824	0,0119	1,5029
24	31,1	14,9	3,5	1,0957	0,1633	0,0217	2,7442
32	31,5	13,6	3,5	1,0869	0,1478	0,0296	3,7456
40	29,0	12,6	3,5	1,0813	0,1362	0,0355	4,4954
48	31,7	10,6	3,5	1,0552	0,1118	0,0479	6,0768

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 4 - Resultados do experimento 4.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	26,0	18,5	3,5	1,0958	0,2027	0,0000	0,0000
8	30,0	16,8	3,5	1,0902	0,1831	0,0100	1,2691
16	33,0	14,8	3,5	1,0772	0,1594	0,0221	2,8069
24	33,0	14,0	3,5	1,0733	0,1503	0,0268	3,4012
32	30,0	13,1	3,5	1,0716	0,1404	0,0319	4,0415
40	33,0	12,7	3,5	1,0519	0,1336	0,0354	4,4815
48	33,0	10,9	3,5	1,0464	0,1141	0,0453	5,7477
56	28,0	10,6	3,5	1,0455	0,1108	0,0470	5,9576
64	33,0	9,8	3,5	1,0402	0,1019	0,0515	6,5332
72	32,0	9,2	3,5	1,0391	0,0956	0,0548	6,9444

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 5 - Resultados do experimento 5.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	27,0	18,5	3,5	1,1142	0,2061	0,0000	0,0000
8	29,0	16,3	3,5	1,1135	0,1815	0,0126	1,5965
16	26,5	15,9	3,5	1,1044	0,1756	0,0156	1,9793
24	31,5	13,9	3,5	1,0934	0,1520	0,0277	3,5094
32	30,0	12,2	3,5	1,0780	0,1315	0,0382	4,8367
40	28,0	11,1	3,5	1,0714	0,1189	0,0446	5,6524
48	32,5	11,0	3,5	1,0688	0,1176	0,0453	5,7410

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 6 - Resultados do experimento 6.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	27,0	18,5	3,5	1,0958	0,2027	0,0000	0,0000
8	25,0	16,5	3,5	1,0897	0,1798	0,0117	1,4860
16	33,0	15,8	3,5	1,1024	0,1742	0,0146	1,8505
24	30,0	14,6	3,5	1,0819	0,1580	0,0229	2,9021
32	25,0	13,8	3,5	1,0694	0,1476	0,0282	3,5749
40	30,0	13,5	3,5	1,0594	0,1430	0,0305	3,8705
48	30,0	11,7	3,5	1,0549	0,1234	0,0406	5,1410
56	24,0	11,5	3,5	1,0536	0,1212	0,0417	5,2870
64	30,0	10,2	3,5	1,0478	0,1069	0,0490	6,2134
72	30,0	10,1	3,5	1,0453	0,1056	0,0497	6,2974

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 7 - Resultados do experimento 7.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	29,0	18,5	3,0	1,1295	0,2090	0,000	0,0000
8	31,0	16,9	3,0	1,1116	0,1879	0,0108	1,3671
16	28,8	16,6	3,5	1,1000	0,1826	0,0135	1,7083
24	31,0	15,5	3,5	1,0950	0,1697	0,0201	2,5428
32	31,5	14,7	3,5	1,0947	0,1609	0,0246	3,1133
40	29,0	13,1	3,5	1,0928	0,1432	0,0337	4,2651
48	32,0	11,2	3,5	1,0461	0,1172	0,0469	5,9499

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 8 - Resultados do experimento 8.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cet (g/mL)	%etanol (v/v)
0	29,0	18,5	3,0	1,1346	0,2099	0,0000	0,0000
8	31,0	17,8	3,0	1,1281	0,2008	0,0047	0,5895
16	28,7	17,1	3,5	1,1125	0,1902	0,0101	1,2743
24	31,0	16,0	3,5	1,1122	0,1780	0,0163	2,0703
32	31,5	15,0	3,5	1,1047	0,1657	0,0226	2,8641
40	29,0	13,9	3,5	1,1028	0,1533	0,0289	3,6689
48	32,0	10,8	3,5	1,0733	0,1159	0,0481	6,0915
56	31,0	10,6	3,5	1,0630	0,1127	0,0497	6,3018
64	28,9	10,4	3,5	1,0523	0,1094	0,0514	6,5114
72	29,6	9,2	3,5	1,0401	0,0957	0,0584	7,4033

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 9 - Resultados do experimento 9.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	27,0	18,5	3,5	1,1102	0,2054	0,0000	0,0000
4	28,0	16,3	3,5	1,1069	0,1804	0,0128	1,6181
12	28,5	16,2	3,5	1,0947	0,1773	0,0143	1,8183
20	27,0	15,6	3,5	1,0891	0,1699	0,0182	2,3006
28	31,0	13,9	3,5	1,0876	0,1512	0,0277	3,5142
36	29,0	12,8	3,5	1,0786	0,1381	0,0344	4,3643
44	27,0	11,2	3,5	1,0728	0,1202	0,0436	5,5252
52	32,0	10,2	3,5	1,0652	0,1087	0,0495	6,2707
60	28,5	10,0	3,5	1,0502	0,1050	0,0513	6,5064

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A 10 - Resultados do experimento 10.

Tempo (h)	Temperatura (°C)	°Bx	pH	ρ (g/mL)	Cs (g/mL)	Cp (g/mL)	%Etanol (v/v)
0	27,0	18,5	3,5	1,1140	0,2061	0,0000	0,0000
4	28,0	17,8	3,5	1,1126	0,1980	0,0041	0,5215
12	28,5	17,2	3,5	1,1105	0,1910	0,0077	0,9780
20	27,0	16,7	3,5	1,1008	0,1838	0,0114	1,4430
28	31,0	15,0	3,5	1,0869	0,1630	0,0220	2,7909
36	29,0	13,8	3,5	1,0777	0,1487	0,0293	3,7183
44	27,5	13,0	3,5	1,0760	0,1399	0,0339	4,2916
52	32,0	11,2	3,5	1,0741	0,1203	0,0439	5,5613
60	28,5	11,1	3,5	1,0693	0,1187	0,0447	5,6649

Fonte: Elaborada pela autora.