

DTCS – CAMPUS III
Departamento de Tecnologia e
Ciências Sociais



UNEB
UNIVERSIDADE DO
ESTADO DA BAHIA

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA - UNEB
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS SOCIAIS – CAMPUS III
COLEGIADO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A
PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE MORANGO**

Lorena Mônica Pacífico de Brito

JUAZEIRO-BA
2022

LORENA MÔNICA PACÍFICO DE BRITO

**ISOLAMENTO E POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A
PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE MORANGO**

Monografia apresentada ao Colegiado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia – UNEB – Campus III, como requisito parcial para avaliação do Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Professor Dr. Adailson Feitoza de Jesus Santos.

JUAZEIRO-BA
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Regivaldo José da Silva/CRB-5-1169

B862i Brito, Lorena Mônica Pacífico de

Isolamento e potencial de leveduras selvagens para a produção de bebida fermentada de morango / Lorena Mônica Pacífico de Brito. Juazeiro-BA, 2022.

58 fls.: il.

Orientador: Prof. Dr. Adailson Feitoza de Jesus Santos.

Inclui Referências

TCC (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) –
Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais.
Campus III. 2022.

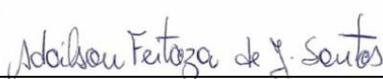
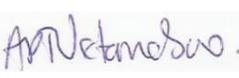
1. Bebida fermentada – Vinho. 2. Saccharomyces. 3. Fermentação alcoólica.
4. Fragaria vesca L.. I. Santos, Adailson Feitoza de Jesus. II. Universidade do Estado da
Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. III. Título.

CDD: 663.13



Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais - DTCS - UNEB
Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia

Aos 18 dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e dois, às 13:30 h, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da discente Lorena Mônica Pacífico de Brito intitulada: “ISOLAMENTO E POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE MORANGO”. Compuseram a banca examinadora os professores abaixo relacionados. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que reuniram-se reservadamente e decidiram pelo conceito de (X) “aprovada(o)” / () “reprovada(a)”, com média final de 9,7 para o Trabalho de Conclusão de Curso. Para constar, redigi a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, vai assinada por mim, Orientador, e pelos demais membros da banca.

Nome Orientador / Dr. Adailson Feitoza de Jesus Santos	Instituição / vínculo: UNEB/Professor	Assinatura: 
Nome / Titulação Dr. Ana Paula Trovatti Uetanabaro	Instituição / vínculo: UESC/Professora	Assinatura: 
sNome / Titulação Dr. Rômulo Batista Vieira	Instituição / vínculo: UNEB/Professor	Assinatura: 

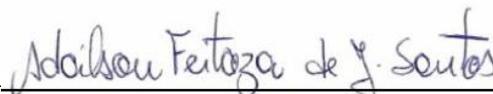
LORENA MÔNICA PACÍFICO DE BRITO

**ISOLAMENTO E POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A
PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE MORANGO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
como pré-requisito parcial à obtenção do grau
de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia do Departamento de Tecnologia
e Ciências Sociais da Universidade do Estado

Aprovado em: 14/07/2022

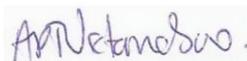
BANCA EXAMINADORA



Prof^o Adailson Feitoza de Jesus Santos
Universidade do Estado da Bahia



Prof^o Rômulo Batista Vieira
Universidade do Estado da Bahia



Prof^a Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Universidade Estadual de Santa Cruz

Juazeiro – BA
Julho de 2022

Dedico este trabalho a todos que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação acadêmica, em especial, a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que auxiliaram no decorrer da minha jornada acadêmica e a tornou mais leve, especialmente:

Em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida e proteção;

À minha mãe, Maria José Pacífico, que sempre foi a minha base e à minha família que apoiou os meus estudos;

Ao orientador Professor Adailson Feitoza que teve papel fundamental na elaboração deste trabalho e na minha formação acadêmica, desde o início do curso e ao Professor Rômulo Vieira que também colaborou para a elaboração deste trabalho;

Agradeço ainda a todos os demais professores que também contribuíram para a minha formação escolar e acadêmica, em especial à Professora Rita Nassur e à Professora Gabriela Aretakis, que foram essenciais na minha formação profissional e pessoal;

À Luany Carvalho pela amizade e cumplicidade em todos os momentos, durante esses cinco anos;

À Liézely Santos e Fernanda Okubo pela amizade e incentivo, e por tornarem meus dias mais alegres. À Emanuela Anunciação e Marianna Hipólito pelo apoio;

A todos os colegas de graduação, à equipe do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Bebidas, em especial Vanessa Caldeira, e à equipe do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, especialmente Sophia Dinas, pelo aprendizado e colaboração para esse trabalho;

Aos meus amigos da Paróquia Santa Rita pelo companheirismo e disponibilidade para me auxiliar em todos os momentos, em especial Thiago Torres e Silvani Lopes;

Por fim, agradeço a Universidade do Estado da Bahia pela estrutura física e à funcionária Jocasta pela ajuda e companhia durante a execução desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Os processos fermentativos de alimentos ocorrem desde a antiguidade com a fabricação de pães e bebidas alcoólicas, como o vinho. Semelhante ao vinho encontra-se também os fermentados de fruta que são bebidas obtidas da fermentação alcoólica do mosto de fruta, que deve conter graduação alcoólica de 4 a 14% (v/v) a 20 °C. A produção dessas bebidas se dá pela atividade de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que transformam os açúcares presentes no mosto em álcool e gás carbônico. A atividade do microrganismo é considerada essencial para dar as características à bebida, mostrando assim, a importância na prospecção e avaliação de linhagens de leveduras para a produção de bebidas fermentadas. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de leveduras selvagens isoladas de frutos regionais para a produção de fermentados de morango. As leveduras isoladas foram avaliadas quanto capacidade fermentativa, assimilação de fontes de carbono, tolerância a temperatura, etanol e pH. Em seguida foram selecionadas três leveduras para produção de bebidas fermentadas de morango e avaliação do processo fermentativo, sendo comparadas a levedura comercial. Ainda foi realizada a modelagem da produção de etanol durante a fermentação. Por fim, as leveduras isoladas e selecionadas se mostraram eficientes nos testes microbiológicos e no processo fermentativo das bebidas, onde apresentaram características similares à levedura comercial, possibilitando que as mesmas sejam classificadas como fermentados de morango, uma vez que se enquadram na legislação.

Palavras-chave: Vinho, *Saccharomyces*, Fermentação alcoólica, *Fragaria vesca* L.

ABSTRACT

The fermentation process of food has occurred since ancient times with the manufacture of bread and alcoholic beverages such as wine. Similar to wine we also find the fruit fermented beverages that are obtained from the alcoholic fermentation of fruit must, which must contain an alcohol content of 4 to 14% at 20 °C. These beverages are produced by the activity of yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae*, which transforms the sugars present in the must into alcohol and carbon dioxide gas. The activity of the microorganism is considered essential to giving the beverage characteristics, thus showing the importance of prospecting and evaluating yeast strains for the production of fermented beverages. Thus, the objective of the present work was to evaluate the potential of wild yeasts isolated from regional fruits for the production of strawberry fermented beverages. The isolated yeasts were evaluated regarding fermentative capacity, assimilation of carbon sources, tolerance to temperature, ethanol and pH. Then, three yeasts were selected for the production of strawberry fermented beverages and evaluation of the fermentative process, being compared to commercial yeast. The modeling of the ethanol production during fermentation was also performed. Finally, the isolated and selected yeasts proved to be efficient in microbiological tests and in the fermentation process of the beverages, where they showed similar characteristics to the commercial yeast, allowing them to be classified as strawberry fermented beverages, since they fit the legislation.

Keywords: Wine, *Saccharomyces*, Alcoholic fermentation, *Fragaria vesca* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas gerais que podem estar presentes na elaboração do fermentado de fruta. Fonte: adaptado VENTURINI et al. (2016).	20
Figura 2. Hidrólise da sacarose em meio aquoso pela enzima invertase. Fonte: LOPES (2016).	23
Figura 3. Esquema da via glicolítica. NELSON (2019).	24
Figura 4. Via metabólica simplificada da fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Fonte: RODRIGUES et al. (2018).	25
Figura 5. Potes de fermentação contendo as bebidas de morango com as leveduras selvagens e comercial. Fonte: autor.	34
Figura 6. Bebidas engarrafadas e rotuladas. Fonte: autor.	35
Figura 7. Resultados representativos das leveduras isoladas que cresceram nas fontes de carbono glicose, maltose, frutose e sacarose. A - Glicose; B – Frutose; C – Maltose; D – Sacarose. Fonte: autor.	38
Figura 8. Resultados representativos do crescimento das leveduras isoladas em diferentes temperaturas. A – 25 °C; B – 30 °C; C - 32° C; D – 37 °C; E – 40 °C. Fonte: autor.....	39
Figura 9. Resultados representativos do crescimento da levedura isolada da uva nos meios de cultura YP com pH 4 e pH 10. Fonte: autor.	41
Figura 10. Resultados representativos do crescimento das leveduras nas etapas do teste de exclusão por estresse. A – 37° C; B – 8% (v/v) de etanol; C – 2% (m/m) de glicose; D – 8% (v/v) de etanol e 2% (m/m) de sacarose. Fonte: autor.	43
Figura 11. Observação microscópica após coloração com cristal violeta. Fonte: autor.....	44
Figura 12. Teor alcoólico durante o período de fermentação das bebidas de morango.	45
Figura 13. pH durante o período de fermentação das bebidas de morango.....	47
Figura 14. Modelagem da produção de álcool etílico durante a fermentação das diferentes leveduras. Fonte: autor.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções de cada componente do mosto para elaboração de bebida fermentada de morango.	33
Tabela 2 – Códigos das leveduras selvagens isoladas de frutos regionais.	36
Tabela 3 - Resultados da capacidade fermentativa testadas com as fontes glicose, frutose e sacarose.	37
Tabela 4 - Resultados da resistência à etanol das leveduras selvagens nas concentrações 10%, 13% e 15% (v/v).	39
Tabela 5 - Resultados do crescimento das leveduras isoladas em meio YP com pH 4 e pH 10.	40
Tabela 6 - Resultados do crescimento das leveduras em exclusão por estresse.	42
Tabela 7 - Caracterização físico-química da polpa de morango.	44
Tabela 8 - Médias dos sólidos solúveis dos fermentados de morango durante a fermentação.	45
Tabela 9 - Médias da acidez (%) dos fermentados de morango durante a fermentação.	47
Tabela 10 - Médias da densidade dos fermentados de morango durante a fermentação.	48
Tabela 11 - Média das bebidas finais de cada tratamento.	48
Tabela 12. Valores dos parâmetros μP e $\ln\mu P$ obtidos.	49

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação de Monod.	27
Equação 2. Taxa de geração de produto (etanol).	28
Equação 3. Quantificação do volume de suspensão.	32
Equação 4. Fórmula para obtenção do teor alcoólico. Smith (2021).	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Biotecnologia de Alimentos	16
3.2 Breve Histórico de Bebidas Alcoólicas	17
3.3 Fermentado de Fruta	18
3.4 Leveduras	21
3.5 Bioquímica da Fermentação Alcoólica	22
3.6 Inovação Tecnológica dos Fermentados	26
3.7 Modelagem do processo fermentativo	26
3.8 Morango (<i>Fragaria vesca</i> L.)	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Seleção das leveduras selvagens	29
4.1.1 Isolamento e purificação de leveduras.....	29
4.1.2 Teste de capacidade fermentativa.....	30
4.1.3 Teste de tolerância a temperatura.....	31
4.1.4 Teste de tolerância a pH.....	31
4.1.5 Teste de exclusão por estresse.....	31
4.1.6 Teste de assimilação de fontes de carbono.....	31
4.1.7 Teste de tolerância ao etanol.....	32
4.1.8 Quantificação da levedura selecionada.....	32
4.2 Elaboração do fermentado	33
4.2.1 Obtenção e caracterização das polpas.....	33

4.2.2	Preparo do inóculo.....	33
4.2.3	Preparo do mosto	33
4.2.4	Chaptalização.....	34
4.2.5	Inoculação	34
4.2.6	Fermentação	34
4.2.7	Envase da bebida.....	34
4.3	Análises físico-químicas.....	35
4.4	Análise estatística	36
4.5	Modelagem da formação de etanol	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Resultados microbiológicos	36
5.1.1	Teste de capacidade fermentativa	36
5.1.3	Teste de tolerância à temperatura.....	38
5.1.4	Teste de tolerância à etanol.....	39
5.1.5	Teste de tolerância à pH.....	40
5.1.6	Teste de exclusão por estresse.....	41
5.2	Resultados físico-químicos.....	44
5.2.1	Caracterização da polpa	44
5.2.2	Acompanhamento da fermentação	44
5.3	Resultados da modelagem da produção de etanol.....	49
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

O processo fermentativo dos alimentos ocorre desde a antiguidade, em especial, na fabricação de pães e bebidas alcoólicas, como a cerveja e o vinho, aos quais possuem um importante papel na vida cultural das sociedades tanto orientais quanto ocidentais (CAMPBELL-PLATT, 2015). Segundo a legislação, o vinho é conceituado como uma bebida produzida a partir da fermentação alcoólica de uva fresca e madura ou do suco de uva fresca (BRASIL, 1974). Somente as bebidas fermentadas de uva (*Vitis vinífera*) podem ser chamadas de “vinho” (OLIVEIRA et al., 2016). Tal bebida é fabricada em várias regiões do mundo e do Brasil, como no Vale do São Francisco, que conta com uma produção de 7,5 milhões de litros por ano (COPELLO, 2021).

Outra bebida semelhante ao vinho é o fermentado de fruta, denominado como uma bebida com graduação alcoólica de 4 a 14% em volume, em uma temperatura de 20° Celsius, sendo obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura, tal fruta deve ser adicionada na nomeação do produto (BRASIL, 2008).

A elaboração dessas bebidas alcoólicas se dá pela atividade de microrganismos, em especial, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que transformam os açúcares presentes no mosto em álcool etílico e gás carbônico (RUSTICK, 2019 e AQUARONE, 2001). Devido as características desejáveis presentes nesta espécie, como rápida iniciação da fermentação, tolerância a etanol, entre outras, se tornou o microrganismo mais utilizado neste processo (VENTURINI, 2016). Porém, existem também outros microrganismos que atuam no processo fermentativo de qualquer fruto e que formam o ácido acético, gerando então, um vinagre (RIBEIRO et al, 2018). Desse modo, há uma necessidade de controle na produção de vinhos, bem como avaliação dos parâmetros do bioprocessos, para manter a qualidade e a agradabilidade da bebida.

Além disso, com a grande aplicabilidade das leveduras na indústria, tem-se o interesse em aprimorar os processos produtivos a fim de se ter um melhor custo-benefício, aumentando a produtividade e diminuindo os gastos (LOPES, 2016). Contudo, na maioria dos processos industriais não são utilizadas as linhagens mais adequadas e que possuam maior desempenho (LOPES, 2016). Conseqüentemente, são necessários estudos envolvendo novas linhagens de leveduras que possuam maior produtividade.

Uma das ferramentas utilizadas para controlar o processo fermentativo é a modelagem matemática que consiste em uma forma de representar e estudar, por meio de equações matemáticas, as variáveis do bioprocessamento (SCHMIDELL et al., 2001), como a quantidade de sacarose, de inóculo e de produção de etanol (VIEIRA, 2020). Assim, a modelagem permite caracterizar a cinética da fermentação organizando informações e observando os componentes e suas interações que ocorrem no bioprocessamento, fazendo com que se possa entender o seu comportamento e corrigir possíveis falhas (SCHMIDELL et al., 2001). Essa ferramenta vem se tornando um aliado no processo industrial, e de grande importância para a produção de fermentados de frutas para se obter uma bebida de qualidade desejável, eliminando custos desnecessários na produção (DALSENTER et al., 2015).

Com efeito, a indústria de bebidas fermentadas pode inovar tecnologicamente com produtos que apresentem novos sabores e características, já que o consumidor busca constantemente variabilidade e qualidade. Dessa forma, para produção de bebidas alcoólicas tem-se uma demanda por pesquisas em busca de novas espécies de leveduras que apresentem maior estabilidade, adaptação climática e características desejáveis, como aroma e sabor (LOPES, 2016; PIETROWSKI, 2011).

A obtenção de leveduras selecionadas com características adaptadas à região é relevante principalmente em regiões com climas elevados, como é o caso da região do Vale do São Francisco. Essa região é situada entre as cidades dos estados da Bahia e de Pernambuco e possui clima tropical semiárido, apresentando temperaturas elevadas quase o ano todo (LEÃO, MARQUES e BARROS, 2021), além de possuir frutos típicos, como o licuri e o maracujá da Caatinga, dos quais se pode obter leveduras adaptadas às características específicas da região.

Assim como no Vale do São Francisco, os fermentados de fruta podem ser fabricados com grande variabilidade no Brasil, diante da ampla diversidade frutífera. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil é o 3º maior produtor de frutas do mundo e uma das frutas que se destaca é o morango (*Fragaria vesca* L.), podendo ser utilizado fresco ou processado.

O morango é um fruto amplamente utilizado na fabricação de diversos alimentos, como geleias e polpas, e conta com uma produção de aproximadamente duzentas mil toneladas por ano no Brasil (ANTUNES e BONOW, 2021), sendo a maior parcela produzida nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio Grande do Sul.

Contudo, esse fruto apresenta uma estrutura frágil e que possui uma alta taxa de atividade respiratória, o que reduz o tempo de vida pós-colheita do fruto *in natura* (ANTUNES, 2007).

Diante disso, uma forma de diminuir esse desperdício é aproveitar esses frutos para a produção de fermentados de fruta, uma vez que o processo fermentativo vem se tornando uma alternativa por ser uma tecnologia eficiente e de baixo custo, introduzindo novas opções para as indústrias de alimentos e para a produção de novas bebidas fermentadas (SILVA et al., 2007). Ademais, pode-se agregar valor ao fruto, o que proporciona o aumento do desenvolvimento econômico pela busca da diferenciação e da qualidade do produto (DE PAULA et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de leveduras selvagens, isoladas de frutos regionais, para a produção de bebidas fermentadas de morango.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de leveduras selvagens isoladas dos frutos: acerola, caju, figo-da-índia, licuri, maracujá da Caatinga, uva e mandacaru;
Selecionar e avaliar a capacidade fermentativa de três leveduras selvagens em comparação com a levedura comercial;
- Analisar o processo fermentativo e a eficiência das leveduras selecionadas em bebidas fermentadas de morango em temperatura ambiente;
- Modelar e simular a formação de etanol ao longo da fermentação;
- Elaborar um novo produto biotecnológico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biotecnologia de Alimentos

A biotecnologia é o conjunto de tecnologias que possam alterar, utilizar e otimizar organismos vivos ou suas partes, células, organelas e moléculas, com a finalidade de gerar produtos, processos e serviços para aplicar economicamente na saúde humana e animal, na agricultura e meio ambiente (JUDICE e BAÊTA, 2005). Sendo considerado um campo multidisciplinar, a biotecnologia trabalha em conjunto

com diversos ramos a fim de obter bens com uso de processos biológicos (AQUARONE et al., 2001). Apesar de ter se destacado há pouco tempo, os processos biotecnológicos são utilizados desde a antiguidade a partir de métodos fermentativos para o preparo de alimentos, como pães, cervejas e vinhos (AQUARONE et. al., 2001). Com isso, os alimentos fermentados estão sujeitos à ação de enzimas e microrganismos para que esses os transformem em produtos com características desejáveis (MALAJOVICH, 2011).

Com o passar do tempo, o homem foi se especializando nos processos fermentativos e desenvolvendo tecnologias adequadas ao ambiente e à matéria-prima utilizada, resultando no que se conhece por biotecnologia de alimentos, que aplica organismos vivos e moléculas bioativas para o processamento de alimentos (CAMPBELL-PLATT, 2015). O emprego de organismos vivos, como leveduras, bactérias e fungos, no preparo desses alimentos fermentados torna-se cada vez mais estudado e está associado à microbiologia industrial, que é o estudo da viabilidade de uso de tais microrganismos na indústria (VICENZI, 2011).

Dentre os alimentos fermentados mais antigos e estudados têm-se as bebidas alcoólicas, consideradas de extrema importância na vida cultural e espiritual da sociedade, tanto oriental como ocidental, sendo que na Europa e no Oriente Médio, a maioria das bebidas alcoólicas nativas são produzidas a partir de frutas. Já na região Ásia-Pacífico, são produzidas em sua maioria a partir de cereais, utilizadas como importantes fontes de nutrientes (CAMPBELL-PLATT, 2015).

3.2 Breve Histórico de Bebidas Alcoólicas

A origem das primeiras bebidas alcoólicas é incerta, contudo, é possível que foram feitas de cevada, tâmara, mel ou uva (VENTURINI, 2016). Entre essas bebidas se tem o vinho, fabricado a partir da uva e é considerado um dos processos mais antigos da civilização, tendo origem na Mesopotâmia, há cerca de oito mil anos a.C. (RIBEIRO et al., 2018). Assim como os vinhos, os fermentados de fruta também começaram a ser produzidos desde a antiguidade, sendo considerado o primeiro produto de fermentação descoberto pelo homem (CAMPBELL-PLATT, 2015). Segundo Venturini (2016), na China foram realizadas análises químicas de compostos orgânicos adsorvidos e preservados em jarras de cerâmicas e mostraram que havia

sido produzida uma bebida fermentada de arroz, mel e frutas há cerca de nove mil anos.

Desde então, a tecnologia utilizada no processo de fabricação dessas bebidas foi se aperfeiçoando à medida que a sociedade também evoluía (VENTURINI, 2016). Têm-se relatos de que a evolução das práticas agropecuárias está relacionada à produção de cervejas e vinhos, já que povos antigos desejavam plantar os insumos da fabricação dessas bebidas (WHITE e ZAINASHEFF, 2010).

Com isso, diferentes povos no planeta desenvolveram e aperfeiçoaram suas próprias técnicas, gerando bebidas com algumas características de suas regiões produtoras, como os vinhos franceses e italianos ou o champanhe, oriundo da região francesa Champagne. Isso mostra que além de gerar desenvolvimento e renda, essas bebidas fermentadas também contribuíram com o desenvolvimento da cultura e tradição dos povos (VENTURINI, 2016).

Assim, o que era tido como empírico, atualmente é um dos maiores setores industriais do mundo, e vem crescendo exponencialmente com o aumento do consumo dessas bebidas, principalmente no ano de 2020 com o isolamento social decorrente da pandemia de Covid-19 (RIOS, 2021), apresentando aumento de 18,4% (OIV, 2021).

3.3 Fermentado de Fruta

Segundo a legislação brasileira, fermentado de fruta é uma bebida com graduação alcoólica de 4 a 14% (v/v), a 20 °C, sendo obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura, tal fruta deve ser adicionada na nomeação do produto (BRASIL, 2008). Desse modo, não só a uva, mas também diversas outras frutas têm sido utilizadas para a fabricação de bebidas alcoólicas. As mais utilizadas são a maçã e a pera, sendo matéria-prima para a produção de sidra e *Perry*, respectivamente (VENTURINI, 2016).

Além disso, através da utilização de diferentes frutas para a fabricação dessas bebidas se desenvolve inovação tecnológica, com novos produtos, e também representa uma alternativa para o aproveitamento de frutas produzidas em excesso, evitando assim, o desperdício. Um dos países que apresenta elevado desperdício é o Brasil, diante da enorme diversidade de frutos produzidos e por ser um insumo bastante suscetível à degradação (FAGUNDES et al, 2015).

Nos últimos anos vêm crescendo o número de pesquisas voltadas para a fabricação de fermentados de fruta, como kiwi, cajá, manga, laranja, entre outros (VENTURINI, 2016), mostrando que a biotecnologia da produção de fermentados de fruta é eficaz. Porém há a necessidade de avaliar e ajustar os parâmetros de fabricação a partir das características e da composição nutricional de cada fruta (MUNIZ et al, 2002).

O processo consiste inicialmente no preparo do mosto, com o fruto desejado, e do inóculo contendo os microrganismos, os quais serão adicionados no mosto após os ajustes necessários. Alguns desses ajustes no mosto são a sulfitagem, essencial para eliminar processos oxidativos e contaminação microbiana, e a clarificação, importante para frutos claros ou vinhos brancos, e que visa diminuir a atividade enzimática e a decantação de partículas grossas em suspensão. Outros reparos que são essenciais para a fermentação é o ajuste da acidez, do pH e o do açúcar. Este último é também denominado de *chaptalização*. Tais ajustes são essenciais para propiciar um ambiente favorável para a ação dos microrganismos (SILVA, LAGO-VANZELA, BAFFI, 2015).

Após o ajuste do mosto, é realizada a inoculação dos organismos vivos no mesmo e então ocorre a fermentação, na qual o tempo pode variar a depender dos microrganismos e da formação de produto desejado, o etanol. No final da fermentação, é feita a trasfegas, onde a bebida é colocada em outro recipiente para remover substâncias precipitadas e então a bebida é filtrada e engarrafada. Dependendo do produto que se deseja, a bebida ainda pode passar pela etapa de envelhecimento, o que propicia maior estabilidade e coloração e ainda, sabor mais macio (SILVA, LAGO-VANZELA, BAFFI, 2015). De modo geral, o processo de fabricação dessas bebidas fermentadas é realizado da mesma forma, como está ilustrado na Figura 1.

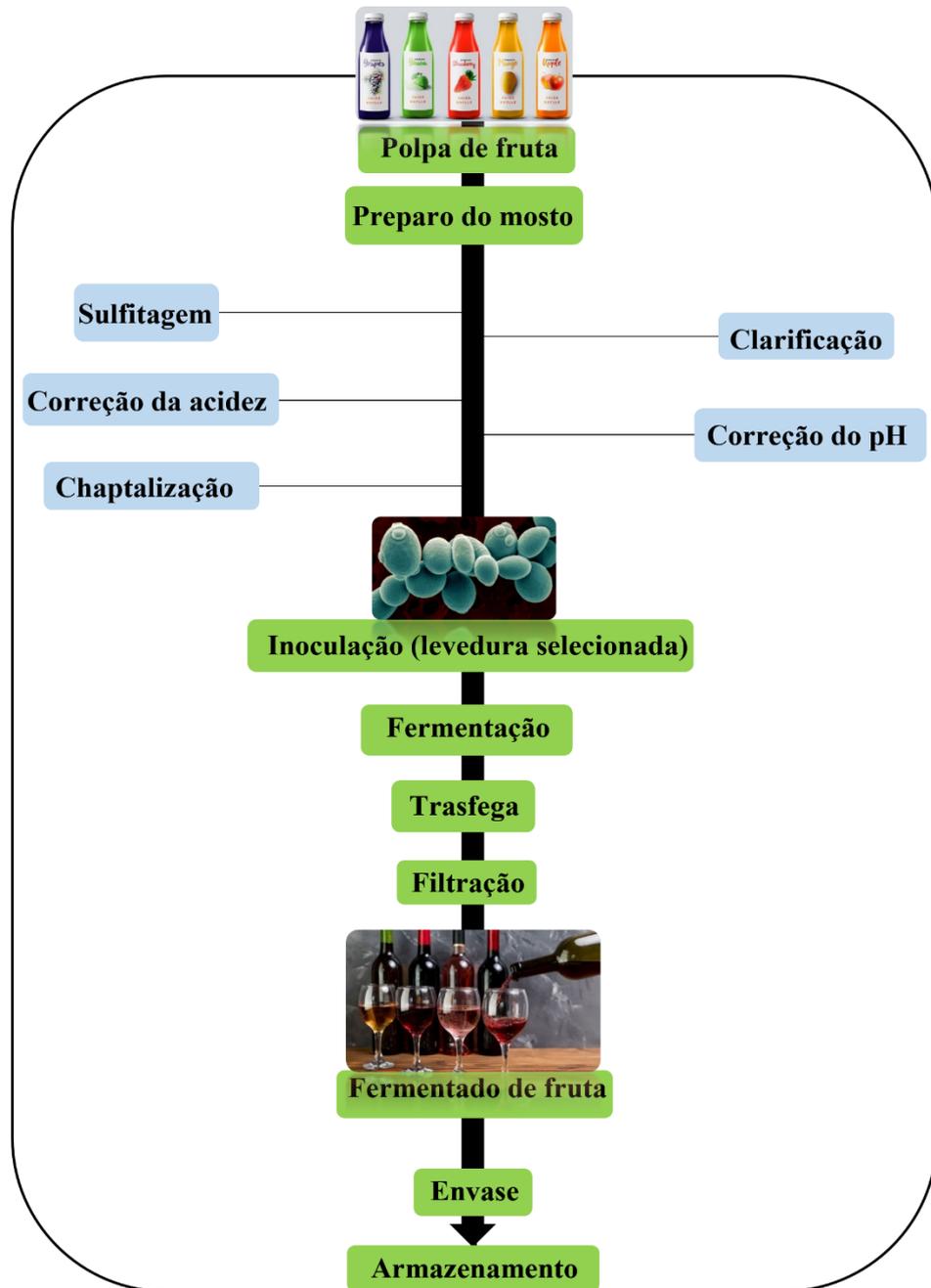


Figura 1. Etapas gerais que podem estar presentes na elaboração do fermentado de fruta. Fonte: adaptado VENTURINI et al. (2016).

Segundo Schmidell et al. (2001), na indústria brasileira, a fermentação ocorre em biorreatores denominados de dornas, sendo constituídas de aço carbono, com altura uma ou duas vezes maior que o diâmetro, sendo a temperatura controlada através de trocadores de calor.

3.4 Leveduras

Os microrganismos são classificados como bactérias, fungos, vírus, protozoários e algumas espécies de algas que são invisíveis a olho nu e podem ser classificados quanto à morfologia, ao crescimento em diferentes faixas de temperatura e pH, à sua via metabólica e ao que produz (RIBEIRO et al., 2018). Como mencionado anteriormente, os microrganismos estão presentes na alimentação da sociedade desde os primeiros séculos, aos quais se destacam as bactérias e os fungos, incluindo as leveduras, pois são os principais responsáveis pelos processos fermentativos. As leveduras são consideradas fungos unicelulares, que se reproduzem por brotamento (ZANARDI, 2016) e a partir do seu metabolismo, transformam a matéria-prima em produtos que sejam desejáveis para o consumo (RIBEIRO et al., 2018).

O principal produto decorrente do metabolismo da levedura é o etanol, que ocorre por via fermentativa. Algumas espécies de bactérias como a *Zymomonas mobilis* também produzem álcool, porém as leveduras ainda são economicamente mais utilizadas (LIMA et al., 2001). A espécie mais estudada e aplicado na indústria biotecnológica é a *Saccharomyces cerevisiae* devido a sua maior eficiência fermentativa em relação às demais espécies (VENTURINI, 2016), sendo utilizados para a produção de etanol e de bebidas alcoólicas como cerveja e vinho.

Para se obter uma fermentação eficiente, as leveduras devem estar expostas a condições favoráveis. Os principais fatores que afetam o seu desenvolvimento são tolerância à etanol, pH, temperatura e disponibilidade de fontes de carbono. Quanto à produção de etanol, as leveduras suportam até a faixa 9,5% (v/v) de etanol presente no mosto (RUSTICK, 2019), acima disso já não se reproduzem mais. Segundo Menezes (1980), nos mostos industriais o pH trabalhado é entre 4,5 e 5,5, pois é a faixa que favorece a levedura e inibe o crescimento de possíveis bactérias contaminantes. Já em relação à temperatura, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são resistentes a altas temperaturas, contudo, a temperatura elevada interfere na viabilidade celular desses microrganismos (SILVA FILHO et al., 2005), desse modo, nas indústrias se recomenda a faixa entre 25 e 36 °C (MENEZES, 1980). Por fim, a principal fonte de carbono das leveduras é a glicose ou outro açúcar, por fornecer energia química necessária para o funcionamento da sua estrutura celular (LOPES, 2016).

A atuação dessas leveduras na produção de bebidas, dependendo das condições que elas sejam submetidas, determinará as suas características. Dentre todas as variáveis da fermentação, a temperatura é a que determina o grau alcoólico do vinho, que ocorre pela geração de etanol, além da acidez que é importante para dar aroma e sabor à bebida (AFONSO, 2019). As leveduras ainda podem interferir no teor nutricional dos alimentos, através da transformação de flavonoides e terpenóides na fermentação (RIBEIRO et al., 2018). Tais compostos conferem aos vinhos propriedades terapêuticas, auxiliando na prevenção de doenças como ataques cardíacos (AFONSO, 2019).

Se espera que a produção de álcool etílico por indústrias de cervejas, vinhos, bebidas destiladas e de combustíveis e a produção de biomassa gerado pela agroindústria continuará fornecendo a maior quantidade de produtos fermentados do mundo (GUIMARÃES, 2005). Desse modo, devido à grande aplicabilidade das leveduras na indústria biotecnológica, há o interesse em aprimorar os processos envolvendo as leveduras com a finalidade de aumentar a produtividade e reduzir os gastos (LOPES, 2016). Uma maneira de aumentar a eficiência e a qualidade da fermentação observada é inocular com uma quantidade de um produto fermentado finalizado para estimular o bioprocessamento, onde se utiliza principalmente o gênero *Saccharomyces* (STEENSELS e VERSTREPEN, 2014). Contudo, ao restringir a microbiota espontânea se limita também as características do produto final (DOMIZIO et al., 2007; ASLANKOOHI et al., 2016). Além disso, a não utilização de linhagens mais adequadas pode reduzir o desempenho fermentativo nos processos industriais (LOPES, 2016).

Segundo estudos de metagenômica, a biodiversidade natural dos fungos é enorme e pouco explorada, sendo apenas uma pequena parcela dessa biodiversidade é utilizada na indústria (LITI et al., 2009; WANG et al., 2012). Dessa forma, é crescente o interesse da indústria em explorar a diversidade das linhagens afim de se ter leveduras diferenciadas e que proporcionem uma maior variabilidade de sabores e aromas na bebida, gerando maior valor agregado no produto (LOPES, 2016).

3.5 Bioquímica da Fermentação Alcoólica

Em bioprocessos, a fermentação é conceitualizada como “atividade microbiana sobre um determinado substrato, com geração de produtos” (RIBEIRO et al., 2018).

No caso dos vinhos e fermentados de fruta, os agentes responsáveis por essa atividade microbiana são as leveduras, fungos unicelulares que, através do seu metabolismo, fermentam determinada matéria-prima, transformando-os em produtos desejáveis ao consumo (RIBEIRO et al., 2018). A levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisie* (SILVA, LAGO-VANZELA, BAFFI, 2015), que fermenta fontes de carbono como sacarose, rafinose, maltose e glicose, transformando-as em etanol (RIBEIRO et al., 2018).

De modo geral, a obtenção de etanol pode ocorrer por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa, esta última é a mais importante e acessível no Brasil, diante do grande número de matérias-primas naturais em todo o país, o que possibilita a produção de álcool todo o ano. O processo fermentativo é comum a todos os substratos açucarados e consiste na transformação desses açúcares em etanol e dióxido de carbono, tal processo é de natureza anaeróbica (SCHMIDELL et al. 2001). Um dos principais açúcares utilizados na fermentação é a sacarose, que a partir da reação de hidrólise obtêm-se a glicose e a frutose (LOPES e BORGES, 2009), como é mostrado na Figura 2.

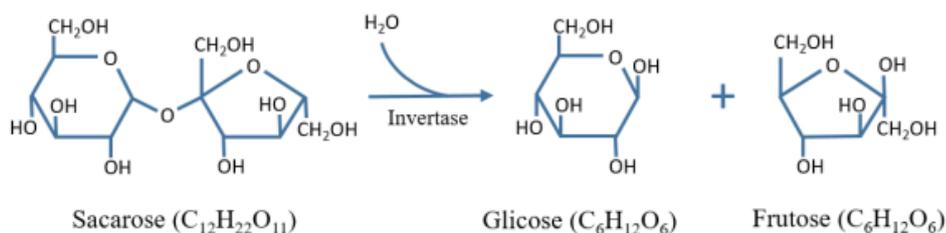


Figura 2. Hidrólise da sacarose em meio aquoso pela enzima invertase. Fonte: LOPES (2016).

A conversão da sacarose em etanol e dióxido de carbono envolve doze reações em cadeia, na qual cada uma é catalisada por uma enzima específica. Essas enzimas são denominadas como “glicolíticas” e suas ações podem ser influenciadas por fatores como temperatura, pH, nutrientes do meio fermentativo, inibidores, entre outros (LIMA et al., 2001). A rota metabólica da fermentação alcoólica mais recorrente é a glicólise, onde uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Dessa forma, as moléculas de piruvato são convertidos nos produtos resultantes (Figura 3).

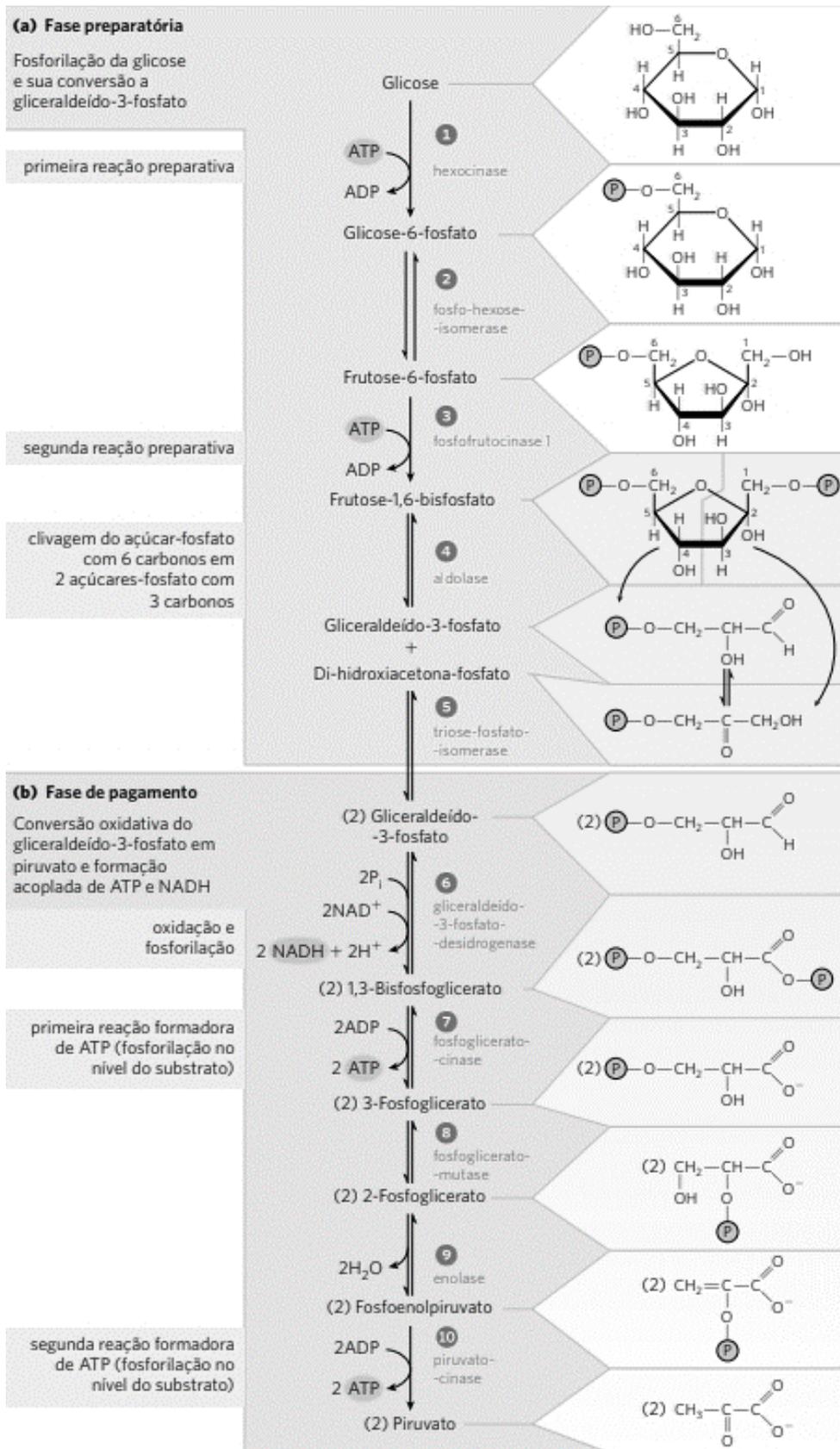


Figura 3. Esquema da via glicolítica. NELSON (2019).

Toda essa reação acontece no citoplasma celular das leveduras, região que processa a fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001). Esse processo é exemplificado de forma simplificada na Figura 4.

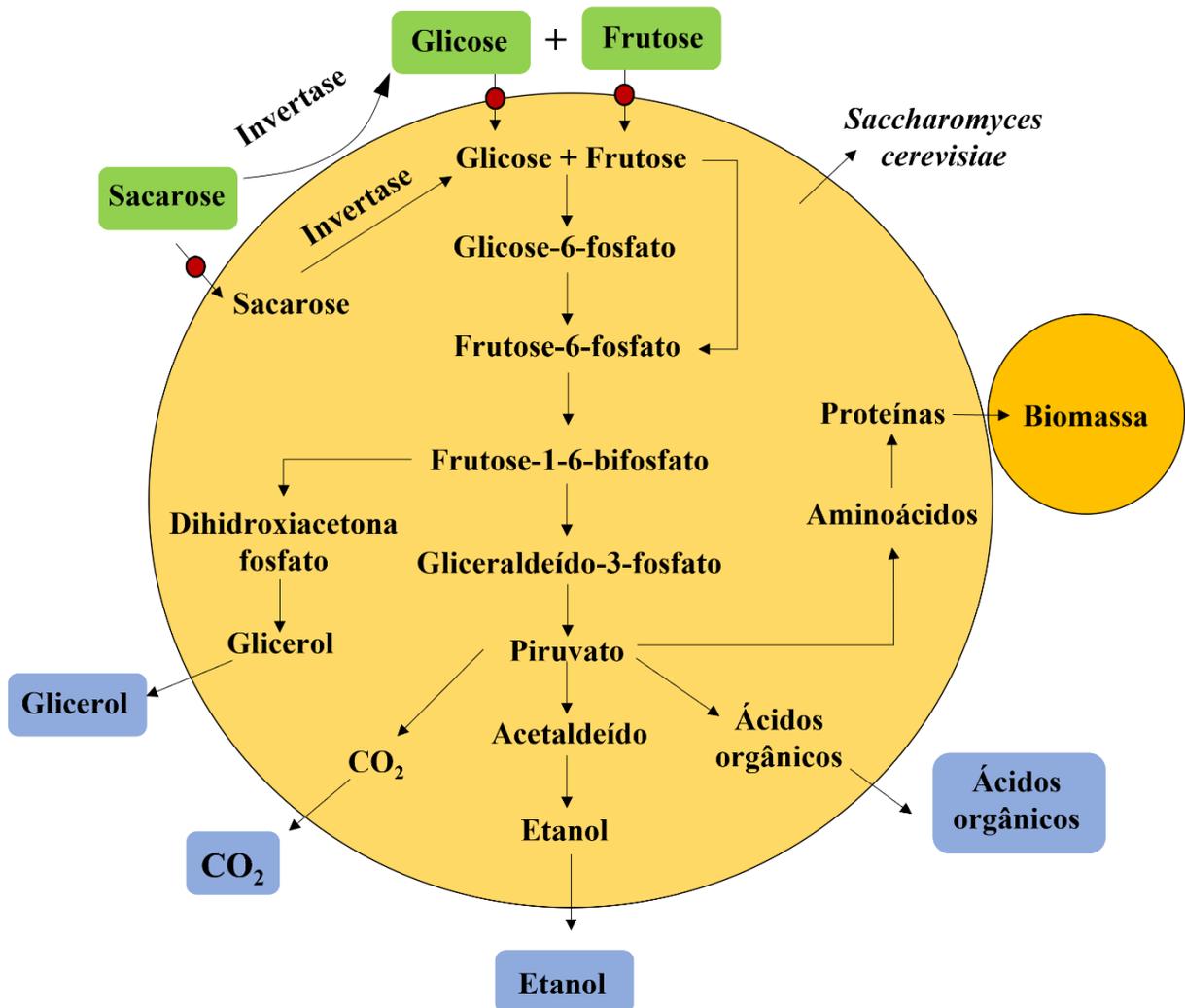


Figura 4. Via metabólica simplificada da fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: RODRIGUES et al. (2018).

O principal objetivo da levedura nesse processo é gerar uma fonte energética para suas funções fisiológicas e biossínteses necessárias para crescer e se reproduzir, o que é importante para a formação de etanol, assim, a formação de novas colônias de leveduras são produzidas como subprodutos. O etanol e o dióxido de carbono resultantes não possuem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA et al., 2001), podendo alcançar concentrações entre 12 e 14% (v/v) de teor

alcoólico e rendimento de 0,4 a 0,5 g de CO₂ por g de açúcar degradado (BARRE et al, 2004).

3.6 Inovação Tecnológica dos Fermentados

Nos últimos anos a população tem cada vez mais se interessado por produtos inovadores e que ofereçam saúde e qualidade nutricional (DUARTE et al, 2021). Aliado ao aumento dessa preocupação, os avanços na tecnologia de vinhos e a melhoria das Boas Práticas de Fabricação (BPF) nas indústrias fez com que diminuísse drasticamente possíveis características indesejáveis, obtendo uma maior padronização dessas bebidas (SILVA, LAGO-VANZELA e BAFFI, 2015). Desse modo, também se observou uma maior exigência com algumas características presentes nos vinhos, que antes não eram considerados. Assim, se tem uma maior atenção na avaliação do comportamento das leveduras e os possíveis defeitos que podem ocasionar, como formação de véus e gás, turvação e defeitos no aroma e sabor da bebida (RIBEIRO et al., 2018; SILVA, LAGO-VANZELA e BAFFI, 2015).

Diante do aumento da exigência do consumidor por produtos com maior qualidade, a indústria de bebidas fermentadas tem demandado por pesquisas em torno de novas espécies de leveduras procurando maior estabilidade, adaptação climática, e características desejáveis, como aroma e sabor, de acordo com sua finalidade. Pois tais leveduras são de extrema importância para o produto final (LOPES, 2016; PIETROWSKI, 2011; VENTURINI, 2016), e com isso, obter inovação através de biotecnologias que tragam maior produtividade.

Portanto, torna-se de grande importância a busca por novas tecnologias e aprimoramento dos processos, assim como a avaliação de leveduras regionais que apresentem novas características às bebidas fermentadas e melhor desempenho, para então, gerar menos gastos no controle no bioprocessamento.

3.7 Modelagem do processo fermentativo

Os processos fermentativos apresentam diversas diferenças dos processos químicos. Isso acontece devido à cinética dos microrganismos, onde as reações químicas e bioquímicas, que ocorrem nos mesmos, são influenciadas por inúmeros fatores que interferem na velocidade do seu crescimento e reprodução e consequentemente na formação de produto (SCHMIDELL, 2001; DUTTA, 2008).

Compreender a cinética da fermentação alcoólica proporciona a elaboração de estratégias de otimização e controle para que se alcance uma maior produção (ANDRIETTA, 1994; DARÉ, 2008). Com isso, a engenharia possui um crescente interesse na modelagem matemática da fermentação e formação de etanol de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* (LOBATO, 2015), fazendo com que o especialista em modelagem deva conhecer o sistema do microrganismo para que possa incorporá-lo no modelo matemático (SCHMIDELL et al., 2001).

De acordo com Bassanezi (1997), um modelo matemático é a união de símbolos e relações matemáticas que expressam um fenômeno em questão, assim, é possível prever o comportamento de um determinado sistema a partir de simulações. O estudo cinético da fermentação analisa os dados de um ou mais componentes de interesse em função do tempo, sendo os mais comuns a concentração de células do microrganismo (X), o consumo de substrato (S) e a formação de produto (P) (HISS, 2001).

Com o passar do tempo, foram formulados diversos modelos matemáticos para expressar o processo fermentativo. O modelo mais simples e utilizado é o de Monod (Equação 1) o qual determina a velocidade específica do crescimento microbiano (X), que é dependente da concentração de substrato limitante no meio (MONOD, 1949).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S}$$

Equação 1. Equação de Monod.

Onde: $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica máxima de crescimento;

S: concentração do substrato limitante (g. L⁻¹);

Ks: constante de Monod (g. L⁻¹), representa a concentração de substrato em que a velocidade de crescimento é metade da velocidade máxima.

A partir do modelo de Monod ainda é possível realizar ajustes nos parâmetros μ_m (crescimento do microrganismo), K_s e $Y_{X/S}$ (rendimento do crescimento microbiano em relação ao substrato), que podem ser obtidos a partir de regressões lineares. Também é possível calcular a taxa de geração de produto (μ_P) (Equação 2) ao longo da fermentação, modelar cada ponto da μ_P seguindo o modelo matemático e por fim, observar a que melhor se mostrou linear com o modelo proposto (HISS, 2001).

$$\mu_P = \frac{dp_f - dp_i}{dt_f - dt_i}$$

Equação 2. Taxa de geração de produto (etanol).

Onde: dp_f : produção final de etanol

dp_i : produção inicial de etanol

dt_f : tempo final

dt_i : tempo inicial

O modelo de Monod é mais aplicado por representar a inibição do crescimento da levedura por consumo do substrato e produção de etanol (PHISALAPHONG, SRIRATTA E TNATHAPANICHAKOON, 2006), assim, a modelagem matemática relaciona os parâmetros cinéticos e ambientais (VIEIRA, 2020).

De acordo com Pacheco (2010), o projeto de uma planta de fermentação precisa passar por uma modelagem detalhada do processo através de modelos cinéticos que possibilitem a obtenção de ótimas condições de operação, o que pode ser realizado por simulação em computador (ANDRIETTA, 1994; DARÉ, 2008). Além de controle, isso também gera otimização da produção. Sonogo et al. (2016) também apresenta a importância do estudo da cinética da fermentação alcoólica, onde se permite ajustar os fatores envolvidos, como pH e temperatura.

3.8 Morango (*Fragaria vesca* L.)

O morango é considerado um fruto silvestre simples (SANTOS, 2021) com popularidade em todo o mundo, tendo diferentes origens a depender da espécie (FRANCO, 2021). Ronque (1998) afirma que sua produção foi iniciada no século XIX e foi evoluindo no decorrer do tempo, aumentando a variedade desse fruto, com a origem de novas cultivares. Dentre essas cultivares se tem Oso Grande, Diamante, Portola, Palomar, Caminho Real, entre outras (SENAR, 2019).

De modo geral, o morango possui coloração vermelha brilhante, textura macia e sabor levemente acidificado, tornando-o bastante atrativo (MATOS et al., 2021). Essa coloração vermelha ocorre pela presença de substâncias bioativas, as antocianinas e os flavonoides, substâncias antioxidantes com propriedades anticarcinogênicas (QUINTÃO, 2018; FRANCO, 2008; FILGUEIRA, 2003). Tal fruto é rico em vitaminas, fibras, ácido fólico e minerais, além de possuir alta concentração de frutose e sacarose (MATOS et al., 2021). Porém, devido o fruto possuir uma estrutura frágil e com alta taxa de atividade respiratória, a conservação do morango *in natura* é curta (ANTUNES, 2007).

Entre os pequenos frutos, o fruto do morangueiro é considerado a cultivar com maior produção e rentabilidade, mostrando assim, sua importância econômica para as regiões produtoras (CARVALHO, 2011). No Brasil, a área produzida com a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é de aproximadamente 5.300 ha (ANTUNES e BONOW, 2021). Com os avanços tecnológicos dos últimos anos, o morango passou a ser encontrado em qualquer época do ano, entretanto, os preços oscilam durante o ano devido às condições climáticas que interferem na produção do morangueiro. Além disso, os preços nos diferentes Estados do país também variam, onde os que mais produzem, possuem menores preços (ANTUNES e BONOW, 2021). Apesar do aumento da produção de morango em diversas regiões do país, ainda está concentrada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio Grande do Sul. Nos últimos seis anos, houve um crescimento de 46% na produção de morango, o que fez com o Brasil aparecesse pela primeira vez nas estatísticas da FAO em 2020, ocupando a posição de 17º entre os maiores produtores desse fruto (ANTUNES e BONOW, 2021).

Como o morango é comercializado principalmente *in natura*, a compra pela aparência é um dos atrativos para a sua compra (SOUZA, 2014), que se colabora para que esse fruto seja amplamente desperdiçado. Além disso, o morango também tem uma alta taxa de desperdício ao longo da cadeia produtiva, cerca de 40%, sendo considerado o 6º alimento mais desperdiçado no Brasil entre frutas e hortaliças (EMBRAPA, 2014). Dessa forma, a produção de bebidas fermentadas de morango torna-se uma alternativa para o aproveitamento de excedentes de safra, contudo, o uso do morango para obtenção de fermentado alcoólico requer uma adaptação do bioprocessamento, já que em nível industrial, as operações aplicadas aos processos de fermentados de frutas são adaptações da produção de vinho de uva (ANDRADE et al., 2014).

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção das leveduras selvagens

4.1.1 Isolamento e purificação de leveduras

Para isolamento e seleção da levedura de interesse, foram coletadas amostras do fruto da acerola, do figo-da-índia (proveniente da palma), do caju e da uva, obtidas

no comércio em estágio inicial de decomposição. Os frutos coletados foram encaminhados e armazenados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UNEB – Campus III. Para a obtenção do isolado, foram processados 40 g de cada fruto em liquidificador com 150 mL de água peptonada (0,05% (m/v) de peptona). Para o procedimento, o liquidificador e os frutos foram desinfestados superficialmente com álcool a 70% (v/v) e hipoclorito de sódio 1% (v/v), para reduzir os riscos de contaminação cruzada. Cerca de 100 µL da solução processada foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura YP para levedura (g. L⁻¹) (20 g de glicose, 3 g de extrato de levedura, 5 g de peptona e 15 g de ágar). Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C durante 72 h até o crescimento e desenvolvimento das primeiras colônias. As colônias isoladas crescidas foram analisadas quanto as suas características macroscópicas e microscópicas. Para seleção, os isolados foram transferidos com auxílio de uma alça estéril, por esgotamento em placas de Petri contendo o meio de cultura descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 30 °C durante 72 h. As colônias puras obtidas, com características morfológicas de leveduras, foram identificadas utilizando códigos específicos e armazenadas em microtubos do tipo *ependorf* com meio sólido inclinado para preservação e manutenção dos isolados.

Em paralelo com as leveduras isoladas dos frutos acerola, caju, figo-da-índia e uva, as leveduras selvagens contidas no banco de dados do LBM foram ativadas e submetidas a testes de capacidade fermentativa, de tolerância à temperatura e à pH, de exclusão por estresse e de assimilação de fontes de carbono, para avaliar o potencial.

4.1.2 Teste de capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa de cada isolado, um volume de 1 mL de inóculo foi transferido para tubos de ensaio, contendo em seu interior tubos de *Durhan* e 10 mL de meio líquido YP suplementado das fontes de carbono (2% (m/v)): glicose, sacarose, maltose e frutose. Os tubos foram mantidos em estufa a 30 °C durante 48 h e foi observado o crescimento das leveduras através da turvação dos meios e a formação de gás no interior dos tubos (GUIMARÃES, 2005).

4.1.3 Teste de tolerância a temperatura

As leveduras selecionadas foram replicadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido YP e mantidas em estufas sob diferentes temperaturas durante 72 h. Para verificar o efeito da temperatura no crescimento foram empregadas as temperaturas: 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C e 50 °C (GUIMARÃES, 2005).

4.1.4 Teste de tolerância a pH

A avaliação da tolerância a pH das leveduras foi realizada utilizando meio líquido YP modificado, com pH ajustado para 4 adicionando HCl e pH 10 adicionando NaOH (0,01% (v/v)). Após a inoculação, as leveduras permaneceram sob a agitação a 150 rpm em temperatura ambiente, por sete dias. Os tubos que apresentaram turbidez no caldo, foram classificados como resultado positivo para o crescimento da cultura e os que não apresentaram turbidez, como resultado negativo (PINHEIRO et al, 2014).

4.1.5 Teste de exclusão por estresse

Para verificar o efeito de cada condição de estresse no crescimento dos microrganismos, as leveduras isoladas foram inoculadas no meio sólido YP e mantidas em estufa a 30 °C durante 72 h como controle. Primeiramente, as leveduras foram crescidas em meio sólido YP a 37 °C durante 72 h. As leveduras que cresceram nesta temperatura foram transferidas para o meio sólido YP contendo 8% (v/v) de etanol e incubadas em estufa a 30 °C durante 72 h. As leveduras resistentes na presença de etanol foram semeadas em meio básico sólido contendo 20 g de glicose e mantidas em estufa a 30 °C durante 72 h. As leveduras que cresceram a essa concentração de glicose foram transferidas para meio sólido YP contendo 20 g de sacarose adicionado de 8% (v/v) de etanol a 30 °C durante 72 h (GUIMARÃES, 2005).

4.1.6 Teste de assimilação de fontes de carbono

As leveduras isoladas foram repicadas em placas de Petri contendo meio YP acrescentado da fonte de carbono a ser testada (glicose 2%, sacarose 2%, maltose 2% e frutose 2% (m/v)). As placas foram incubadas em estufa à 30 °C durante 72 h e foi observado o crescimento das leveduras (GUIMARÃES, 2005).

4.1.7 Teste de tolerância ao etanol

Para verificar o efeito da concentração de etanol no crescimento, as leveduras selecionadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido YP com suplementação de etanol nas concentrações variáveis de 10% (v/v), 13% (v/v) e 15% (v/v). Os tubos foram mantidos em estufa a 30 °C durante 72 h (GUIMARÃES, 2005).

A partir dos resultados obtidos, as cepas que apresentaram melhor desempenho foram selecionadas para a produção das bebidas. Tais leveduras foram coradas com cristal violeta e observadas em microscópio para verificar suas características morfológicas.

4.1.8 Quantificação da levedura selecionada

Para a quantificação, as leveduras selecionadas para a produção das bebidas foram ativadas em placas de Petri contendo meio de cultura YP e mantidas em temperatura ambiente durante 48 h. Após o crescimento das leveduras, foi adicionado 5 mL de solução salina (0,85% (m/v)) nas placas e feita a raspagem com alça de *Drigalsk*. A suspensão foi transferida para tubos Falcon esterilizados. Em seguida foi realizada a diluição da suspensão para 10⁻¹ (v/v), 10⁻² (v/v), 10⁻³ (v/v) e 10⁻⁴ (v/v) e foi determinada a densidade óptica (DO) no espectrofotômetro a 570 nm de absorbância. A partir das diluições, foram transferidos 10 µL de suspensão via capilaridade para a câmara de Neubauer, onde no microscópio - objetiva de 40 x -, foi observada e quantificada as células contidas na amostra. A soma da quantificação foi aplicada na equação 3 para se obter o volume de suspensão de cada levedura que foi utilizada nas respectivas bebidas.

$$V_{suspensão} = \sum \frac{4}{4} \times 4 \times 10000 \times Fator\ de\ diluição$$

Equação 3. Quantificação do volume de suspensão.

Onde:

$V_{suspensão}$: Volume de suspensão das colônias;

$\sum \frac{4}{4}$: Somatório da quantidade de células observadas no microscópio;

Fator de diluição: Fator de diluição da suspensão da amostra observada no microscópio.

4.2 Elaboração do fermentado

Todo o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave e em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) e álcool 70% (v/v).

4.2.1 Obtenção e caracterização das polpas

As polpas de morango foram obtidas na fábrica *Valle Fruit*, situada na cidade de Petrolina-PE, e avaliadas quanto ao °Bx, pH e teste de acidez.

4.2.2 Preparo do inóculo

Inicialmente a levedura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) identificada como *Fermentis* – w34/70, obtida de cervejaria local, foi hidratada com 10 mL de água mineral aquecida (38 - 40 °C) na proporção de 0,2 g. L⁻¹ (0,4 g) e deixada em descanso para ativação por 40 min. O inóculo da levedura selvagem selecionada, foi previamente preparado 24 h antes no LBM, onde sua quantidade foi baseada na contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

4.2.3 Preparo do mosto

O preparo das bebidas foi feito no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBM) da UNEB – Campus III.

Para o preparo dos mostos, as polpas foram descongeladas e diluídas na proporção 660 mL de água mineral – 220 g de polpa, e processadas com auxílio de um liquidificador previamente esterilizado com hipoclorito de sódio 1% (v/v) e álcool 70% (v/v). Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade de água mineral ao mosto, completando 2 L (Tabela 1). Os mostos foram depositados em fermentadores com capacidade de 2,5 L, contendo saída de ar (Figura 5). Após o preparo do mosto, foi medido o °Bx para ser feito o ajuste do açúcar durante a *chaptalização*.

Tabela 1 - Proporções de cada componente do mosto para elaboração de bebida fermentada de morango.

Tratamento	Inóculo (mL)	Água (mL)	Suco (mL)	Polpa (g)	Açúcar (g)
CONTROLE	10,0	800	1200	400	250
ACE2	5,00	800	1200	400	250
LIC2	6,82	800	1200	400	250

MAR11	3,12	800	1200	400	250
--------------	------	-----	------	-----	-----

4.2.4 Chaptalização

Para ajustar a quantidade de açúcar do mosto, foi adicionado 250 g de sacarose comercial em todas as bebidas.

4.2.5 Inoculação

Após 40 min da ativação da levedura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), foi feita a inoculação no primeiro mosto, com 10 mL da levedura. Nos demais mostos foram adicionados 5, 6,82 e 3,12 mL dos inóculos das leveduras selvagens ACE2, LIC2 e MAR11, respectivamente (Tabela 1).

4.2.6 Fermentação

A fermentação teve duração de 10 dias e foi realizada à temperatura ambiente (entre 27 e 32 °C), com monitoramento a cada dois dias do teor de sólidos solúveis (%), densidade, acidez total e teor alcoólico, coletando-se, aproximadamente 50 mL do mosto em fermentação em cada tempo de avaliação até a obtenção da bebida final.



Figura 5. Potes de fermentação contendo as bebidas de morango com as leveduras selvagens e comercial. Fonte: autor.

4.2.7 Envase da bebida

No final da fermentação, as bebidas foram filtradas e transferidas para recipientes de vidro transparentes, rotuladas (Figura 6) e armazenadas em geladeira a 6 °C, por 8 dias, para estabilização.



Figura 6. Bebidas engarrafadas e rotuladas. Fonte: autor.

4.3 Análises físico-químicas

Durante o processo fermentativo, as bebidas foram avaliadas a cada dois dias, em triplicata, quanto à:

- Densidade, utilizando densímetro (mercúrio);
- pH, realizado por potenciometria de acordo com AOAC (2012);
- Acidez total titulável, determinada por titulação com NaOH 0,1N utilizando fenolftaleína como indicador com resultados expressos em % de ácido cítrico (BRASIL, 1986);
- Teor alcoólico, foi calculado conforme dados de densidade utilizando a equação 4:

$$T. A. (\%) = \frac{(Densidade\ inicial - Densidade\ final) \times 1000}{7,36}$$

Equação 4. Fórmula para obtenção do teor alcoólico. Smith (2021).

- Sólidos solúveis (SS), foram obtidos por refratometria em refratômetro digital (IONLAB, Araucária, PR, Brasil);

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey (5%) com auxílio do *software* SISVAR®.

4.5 Modelagem da formação de etanol

Os resultados da produção de álcool etílico durante a fermentação foram submetidos à modelagem, com auxílio do *software* Microsoft Excel (2016). Para modelar o comportamento das leveduras utilizadas, primeiramente, foi medida a velocidade específica de cada ponto das curvas de produção de etanol dos tratamentos. O modelo matemático utilizado foi de Monod (1949) (Equação 1), onde foi calculada a taxa de geração do produto (μ_P), a partir do fator de rendimento do produto ($Y_{P/S}$) e em seguida, foi linearizado ($\ln\mu_P$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados microbiológicos

As leveduras selvagens isoladas e ativadas dos frutos regionais estão expostas na Tabela 2.

Tabela 2 – Códigos das leveduras selvagens isoladas de frutos regionais.

Frutos	Leveduras
Acerola	ACE1, ACE2
Caju	CAJ1
Licuri	LIC2
Mandacaru	MAD4, MAD6, MAD7
Maracujá da Caatinga	MAR11, MAR14, MAR19, MAR22, MAR23
Figo-da-Índia	PAL1, PAL2
Uva	UVA1

5.1.1 Teste de capacidade fermentativa

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as leveduras da acerola, do licuri, da uva e algumas do maracujá da Caatinga apresentaram capacidade fermentativa e formação de gás carbônico (CO₂), como está destacado na Tabela 3. A espécie de levedura mais utilizada para fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que tem a capacidade de transformar os açúcares contidos no mosto em etanol e gás carbônico (AQUARONE, 2001). Dentre os açúcares se destaca a sacarose, que é convertido em glicose e frutose (LOPES e BORGES, 2009). Em vista disso, é essencial testar essas fontes de substrato com novas leveduras selecionadas.

Tabela 3 - Resultados da capacidade fermentativa testadas com as fontes glicose, frutose e sacarose.

Levedura	Glicose	Frutose	Sacarose
ACE1	++	+	+
ACE2	++	+	++
CAJ1	-	-	-
LIC2	+	+	+
MAD4	-	-	-
MAD6	-	-	-
MAD7	-	-	-
MAR1	+	-	+
MAR3	+	+	+
MAR10	-	-	-
MAR11	+	+	+
MAR14	-	-	-
MAR19	-	-	-
MAR22	+	+	+
MAR23	+	+	+
PAL1	-	-	-
PAL2	-	-	-
UVA1	++	+	+

Legenda: (++) crescimento abundante; (+) crescimento normal; (-) ausência de crescimento

5.1.2 Teste de assimilação de fontes de carbono

Uma maneira de identificar estirpes de *S. cerevisiae* é por meio da chave de identificação proposta por Vaughan-Martini e Martini (1993), que consiste na realização de testes fisiológicos com diferentes fontes de carbono e nitrogênio para verificar a assimilação ou não dessas fontes por meio das leveduras analisadas (BARCELOS, 2021). Assim sendo, as leveduras avaliadas foram submetidas às quatro fontes assimiladas pela *S. cerevisiae*: glicose, frutose, maltose e sacarose.

Os resultados indicam que as leveduras apresentaram melhor desempenho nos meios contendo as fontes glicose e frutose, isso possivelmente ocorre pelo fato das leveduras possuírem uma ordem preferencial no uso de carboidratos, os quais os primeiros são a glicose e a frutose, seguido da sacarose e da maltose (WHITE e ZAINASHEFF, 2010). Ademais, a glicose e a frutose são moléculas mais simples, o que facilita a entrada direta na via glicolítica (LOPES, 2016). Já no meio contendo maltose, as leveduras provenientes do figo-da-índia, mandacaru e caju apresentaram

pouco crescimento. No meio contendo sacarose, as leveduras isoladas do maracujá da Caatinga, do licuri, da acerola, da uva e do mandacaru cresceram, sendo que cinco das leveduras testadas (27%) apresentaram um crescimento elevado, ocupando grande parcela das placas (Figura 7).

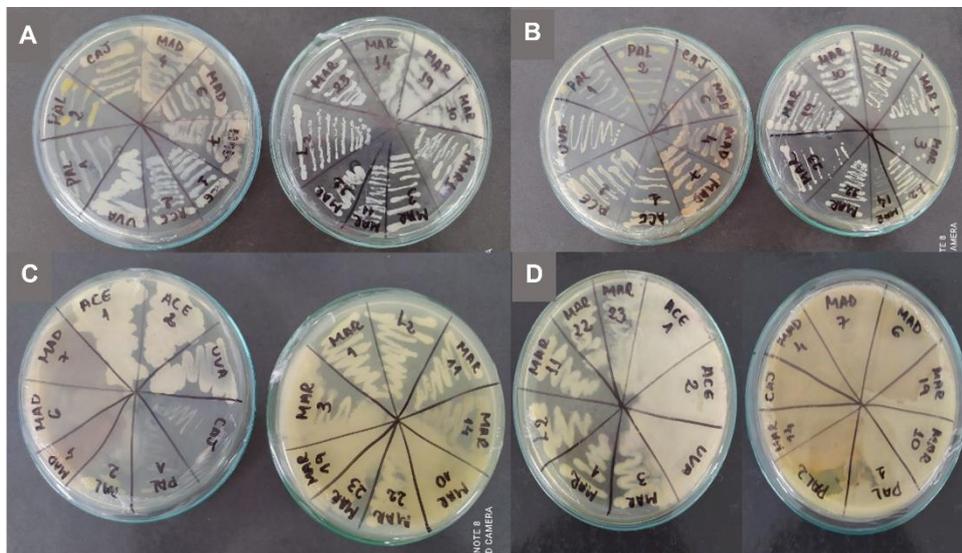


Figura 7. Resultados representativos das leveduras isoladas que cresceram nas fontes de carbono glicose, maltose, frutose e sacarose. A - Glicose; B – Frutose; C – Maltose; D – Sacarose. Fonte: autor.

5.1.3 Teste de tolerância à temperatura

Para avaliar a tolerância à temperatura, as leveduras foram submetidas às temperaturas de 25, 30, 32, 37 e 40 °C. Como demonstrado na figura 8, todas as leveduras cresceram na temperatura 25 °C, com exceção da MAR14, indicando que esta não tolera temperaturas abaixo de 30 °C. Na temperatura 32 °C somente a levedura CAJ1 não cresceu, que também não tolerou as temperaturas 37 e 40 °C. Nessas mesmas temperaturas (37 e 40 °C), sete leveduras (38%) cresceram de forma abundante, se sobrepondo a outras que cresceram. As leveduras do figo-da-índia apresentaram pouco ou nenhum crescimento nessa faixa. De modo geral, a melhor temperatura de crescimento foi 30 °C, onde se destacaram as leveduras isoladas da uva, acerola, licuri e maracujá da Caatinga. Isso indica que a utilização de tais leveduras se mostra eficiente em regiões que possuem temperaturas elevadas, como o semiárido brasileiro.

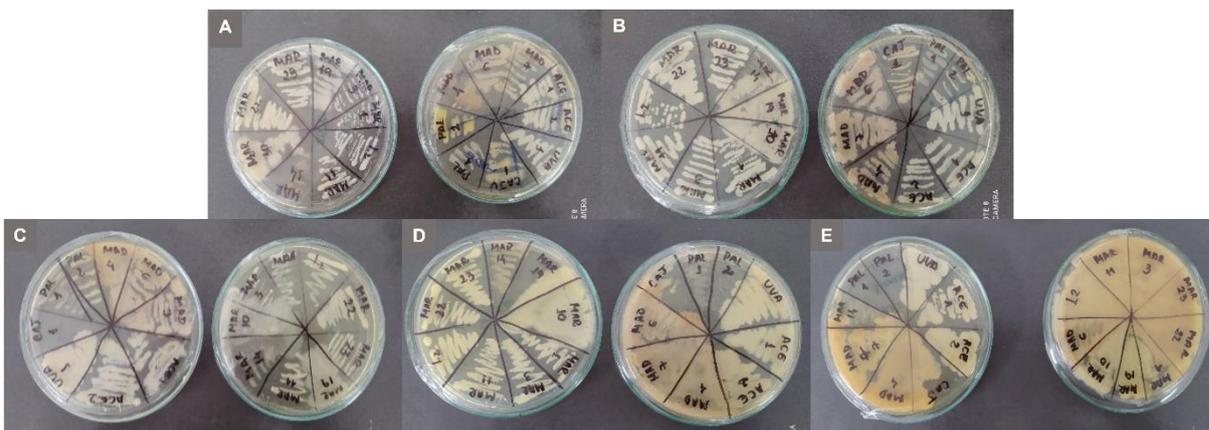


Figura 8. Resultados representativos do crescimento das leveduras isoladas em diferentes temperaturas. A – 25 °C; B – 30 °C; C - 32° C; D – 37 °C; E – 40 °C. Fonte: autor.

5.1.4 Teste de tolerância à etanol

A alta concentração de etanol pode gerar efeitos citotóxicos para as leveduras (GIBSON et al., 2007), o que conseqüentemente afeta o seu desempenho durante a fermentação (OLIVEIRA et al., 2008). Por isso é relevante que as leveduras possuam tolerância à quantidade de etanol presente no mosto (LOPES, 2016). Esse parâmetro também é importante por ser um dos fatores que mais influenciam na fermentação, já que as leveduras suportam a presença de etanol até a faixa de 9,5% (v/v) (RUSTICK, 2019).

Para avaliar a tolerância à etanol, as leveduras foram inoculadas em meios com diferentes concentrações de etanol (10% (v/v), 13% (v/v) e 15% (v/v)). Entre os microrganismos observados, os que apresentaram resistência acima de 13% (v/v) foram ACE1, ACE2, LIC2, MAR11 e UVA1 (Tabela 4), onde se destacaram a ACE1, ACE2 e UVA1 por formarem grande quantidade de gás carbônico (CO₂). Isso indica que tais leveduras possuem tolerância à altas concentrações, mantendo assim, a capacidade de continuar metabolizando. Os microrganismos MAR22 e MAR23 resistiram somente até 10% (v/v), o que as enquadra na faixa indicada por Rustick (2019), mencionada anteriormente. Já as demais não cresceram nas concentrações testadas.

Tabela 4 - Resultados da resistência à etanol das leveduras selvagens nas concentrações 10%, 13% e 15% (v/v).

Levedura	10% (v/v)	13% (v/v)	15% (v/v)
ACE1	+	+	+
ACE2	+	+	+
CAJ1	-	-	-

LIC2	+	+	+
MAD4	-	-	-
MAD6	-	-	-
MAD7	-	-	-
MAR1	-	-	-
MAR3	-	-	-
MAR10	-	-	-
MAR11	+	+	+
MAR14	-	-	-
MAR19	-	-	-
MAR22	+	-	-
MAR23	+	-	-
PAL1	-	-	-
PAL2	-	-	-
UVA1	+	+	+

Legenda: (+) crescimento normal; (-) ausência de crescimento

5.1.5 Teste de tolerância à pH

Durante o processo fermentativo, as leveduras podem passar por condições estressantes que afetam a vitalidade e a viabilidade celular (LOPES, 2016), por isso, antes da inoculação, o mosto precisa ser ajustado para apresentar condições favoráveis aos microrganismos. Dentre esses ajustes se tem o pH que deve estar na faixa entre 4,5 e 5,5 com a finalidade de não só favorecer a levedura, mas também inibir o crescimento de bactérias contaminantes (MENEZES, 1980). Dessa forma, esse parâmetro é relevante para a testagem em novas leveduras.

No teste de tolerância à pH, 50% das leveduras isoladas apresentaram resistência aos meios com pH 4 e com pH 10, incluindo as leveduras ACE1, ACE2, LIC2, MAR1, MAR3, MAR11, MAR22, MAR23 e UVA1 (Tabela 5), sendo a UVA1 a que mais se destacou (Figura 9), apresentando bolhas nos tubos de *Durhan*. Contudo, as leveduras do figo-da-índia não foram capazes de tolerar nenhum dos meios testados. Tendo como parâmetro o vinho, o pH 4 é mais relevante, pois é a faixa encontrada na bebida (4,1 – 4,4) (EMBRAPA, 2000).

Tabela 5 - Resultados do crescimento das leveduras isoladas em meio YP com pH 4 e pH 10.

Levedura	pH 4	pH 10
ACE 1	++	+
ACE 2	++	++
CAJ 1	+	-

LIC02	+	+
MAD 4	+	-
MAD 6	-	+
MAD 7	+	-
MAR 1	+	+
MAR 3	+	+
MAR 10	-	+
MAR 11	+	+
MAR 14	-	+
MAR 19	-	+
MAR 22	+	++
MAR 23	+	+
PAL 1	-	-
PAL 2	-	-
UVA 1	++	++

Legenda: (++) crescimento abundante; (+) crescimento normal; (-) ausência de crescimento



Figura 9. Resultados representativos do crescimento da levedura isolada da uva nos meios de cultura YP com pH 4 e pH 10. Fonte: autor.

5.1.6 Teste de exclusão por estresse

A maior parte das leveduras isoladas de processos fermentativos, como por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae*, são consideradas adaptadas às condições observadas nas dornas de fermentação (PATARO et al., 2000). Tais condições incluem temperatura de 37 °C, meio com 50% e 8% (v/v) de etanol (GUIMARÃES, 2005), por isso, é relevante testar esses fatores.

Para os testes de exclusão por estresse, as leveduras foram submetidas à diferentes tipos de estresse no meio de cultura, em etapas, onde a medida em que as

leveduras cresciam, passavam para a etapa seguinte. Como é possível observar na Tabela 6, das 18 espécies testadas, apenas 12 cresceram na temperatura de 37 °C. Quando essas leveduras foram inoculadas em meio contendo 8% (v/v) de etanol, apenas a MAR14 não cresceu. Todas as leveduras que passaram para a etapa seguinte - meio com 2% (m/m) de glicose - cresceram, entretanto, a PAL1 demonstrou pouco crescimento, sendo assim, descartada para a fase com o meio YP contendo 8% (v/v) de etanol e 2% (m/m) de sacarose. Nessa última fase, todas as leveduras se desenvolveram, indicando que possuem tolerância (Figura 10).

Tabela 6 - Resultados do crescimento das leveduras em exclusão por estresse.

TESTE	LEVEDURAS
37 °C	UVA, ACE1, ACE2, MAD6, PAL1, MAR1, MAR3, MAR11, MAR22, MAR23, MAR14 e LIC2.
Meio YP com 8% (v/v) de etanol	UVA, ACE1, ACE2, MAD6, PAL1, MAR1, MAR3, MAR11, MAR22, MAR23 e LIC2.
Meio YP com 2% de glicose	UVA, ACE1, ACE2, MAD6, PAL1, MAR1, MAR3, MAR11, MAR22, MAR23 e LIC2.
Meio YP com 8% (v/v) de etanol e 2% de sacarose	UVA, ACE1, ACE2, MAR1, MAR11, MAR22, MAR23 e LIC2.

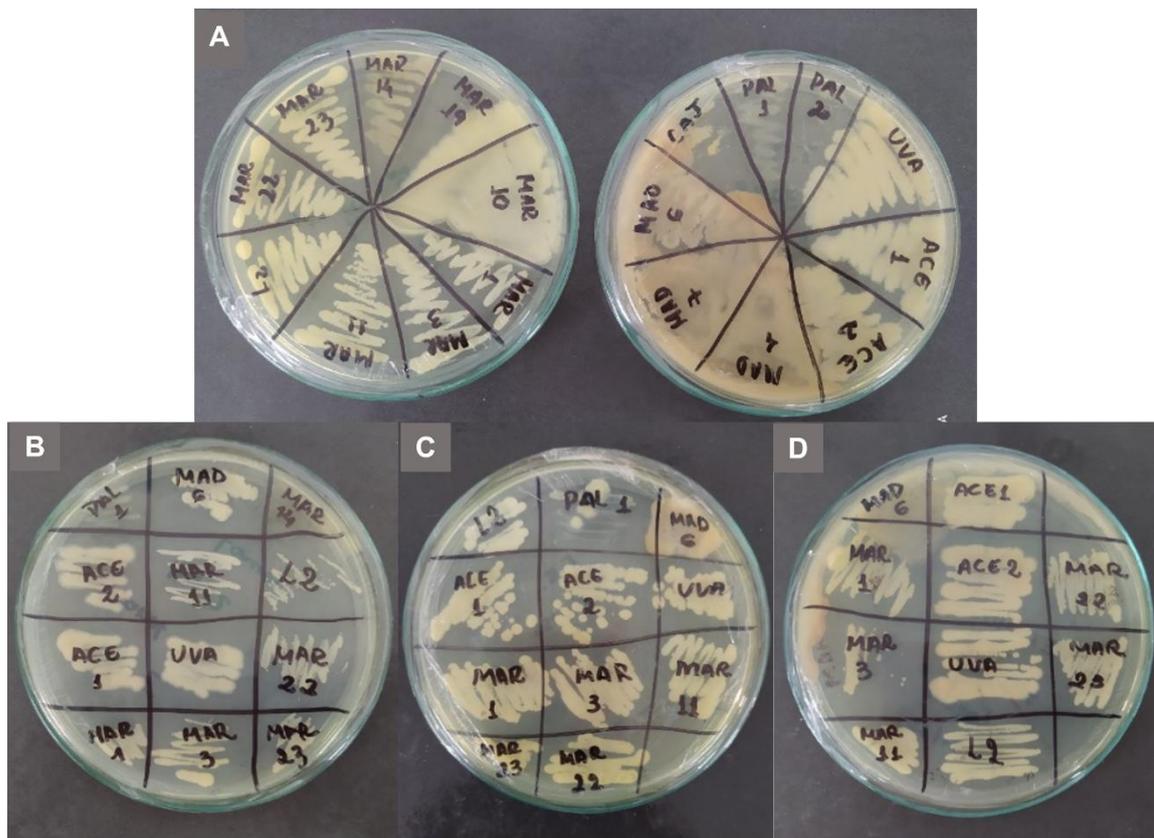


Figura 10. Resultados representativos do crescimento das leveduras nas etapas do teste de exclusão por estresse. A – 37° C; B – 8% (v/v) de etanol; C – 2% (m/m) de glicose; D – 8% (v/v) de etanol e 2% (m/m) de sacarose. Fonte: autor.

A partir dos resultados obtidos nos testes realizados, foram selecionadas as leveduras selvagens ACE2, LIC2 e MAR11 para serem avaliadas para a produção dos fermentados de morango e comparadas com a levedura comercial. As leveduras selvagens selecionadas foram observadas em microscópio após coloração com cristal violeta para examinar as suas características morfológicas (Figura 11) e comparar com o gênero *Saccharomyces* que possuem células circulares, ovais ou cilíndricas (BARNETT, 1992).

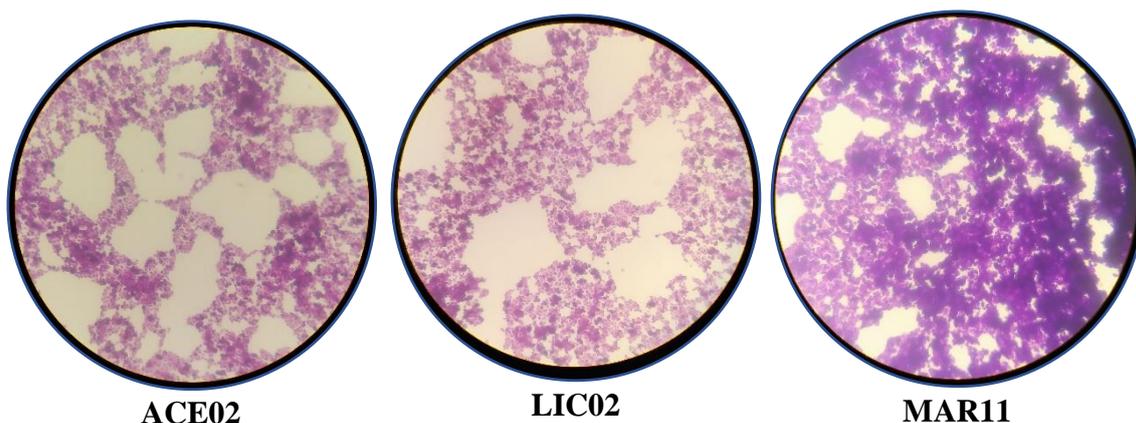


Figura 11. Observação microscópica após coloração com cristal violeta. Fonte: autor.

5.2 Resultados físico-químicos

5.2.1 Caracterização da polpa

As polpas de morango utilizadas, adquiridas do mesmo lote, foram analisadas quanto à acidez total, pH e sólidos solúveis. Os resultados das análises realizadas para a caracterização da polpa de morango estão apresentados na Tabela 7.

No processamento de bebidas, uma grande parcela das frutas utilizadas possui baixo teor de açúcar e acidez, fazendo-se necessário ajustes com a adição de açúcar e água, para assim, se obter um produto com características desejáveis (ARRUDA et al., 2003). Durante a elaboração dos fermentados de morango, foi necessário realizar o ajuste dos sólidos solúveis – para aproximadamente 15 °Brix - por meio da adição de sacarose para que se tivesse maior disponibilidade de substrato no mosto. No entanto, o pH não precisou ser ajustado, já que se mostrou na faixa indicada por Menezes (1980). A acidez obtida foi baixa, não necessitando de ajuste.

Tabela 7 - Caracterização físico-química da polpa de morango.

Variáveis Analisadas	Polpa de Morango
Acidez Total (%)	0,69
pH	4,61
Sólidos Solúveis (°Brix)	4,4

5.2.2 Acompanhamento da fermentação

Durante a fermentação foram coletadas amostras a cada dois dias, decodificados como pontos (P1 - P6), que foram analisadas quanto a sólidos solúveis (SS), pH, acidez total, densidade, e teor alcoólico, assim como as bebidas finais.

Segundo Gouveia et al. (2014), os sólidos solúveis constituem a quantidade total de açúcares, como sacarose e frutose, e outros sólidos solúveis presentes na amostra. Esses açúcares são as fontes de carbono que os microrganismos convertem em álcool (AQUARONE, 2001), dessa forma, pode-se observar a correlação desses fatores. Durante o processo fermentativo, as bebidas variaram de modo expressivo entre os tratamentos, onde as leveduras MAR11 e LIC2 apresentaram comportamentos semelhantes, com os menores valores (Tabela 8), apontando que essas leveduras apresentaram maior eficiência na conversão dos açúcares presentes no mosto em etanol.

Tabela 8 - Médias dos sólidos solúveis dos fermentados de morango durante a fermentação.

Tratamentos	Médias (°Brix)
COMERCIAL	7,57 a*
ACE2	7,03 b
MAR11	6,60 c
LIC2	6,53 c

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Isso é comprovado através dos valores da produção de etanol, apresentados na Figura 12, onde as bebidas contendo essas mesmas leveduras (MAR11 e LIC2), obtiveram maior teor alcoólico. Apesar disso, todas as leveduras foram capazes de continuar fermentando acima da tolerância que esses microrganismos suportam (9,5%) (RUSTICK, 2019).

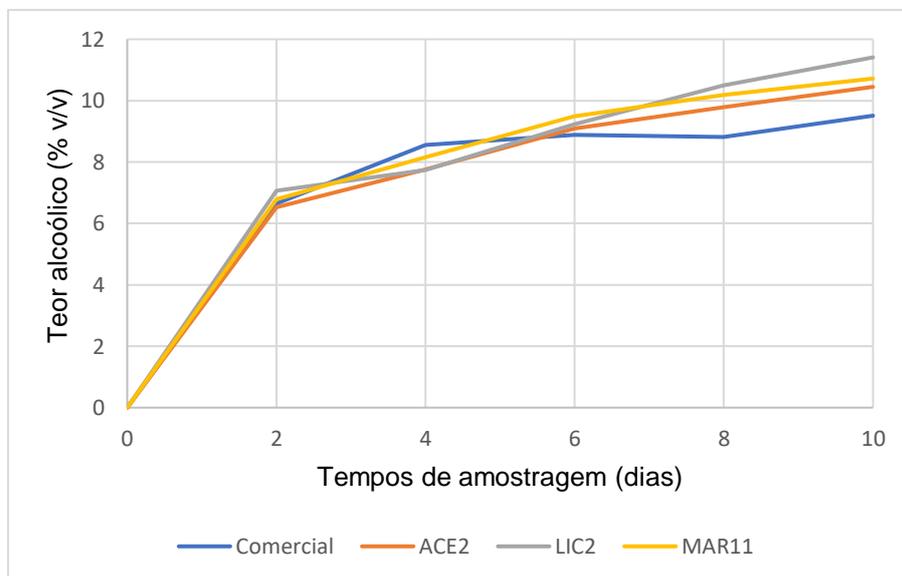


Figura 12. Teor alcoólico durante o período de fermentação das bebidas de morango.

A quantidade de SS residual presente nas bebidas finais se manteve semelhante entre as leveduras selvagens (Tabela 11), indicando uma diferença acentuada em relação à levedura comercial (5,8 °Brix). Esse valor é semelhante a outros fermentados de fruta também produzidos com leveduras comerciais. Neves (2018) observou 5,2 °Brix em fermentado de caju, enquanto Silva (2011) obteve 5,5 °Brix em fermentado de manga.

As bebidas fermentadas podem ser classificadas de acordo com a quantidade de açúcar residual, como seco, meio seco e suave com concentrações de açúcar nas bebidas finais de até 5 g. L⁻¹, entre 5 e 20 g. L⁻¹ e acima de 20 g. L⁻¹, respectivamente (COSTA et al., 2017). A partir dessa classificação, as bebidas de morango produzidas podem ser consideradas como do tipo entre seco (leveduras selvagens) e meio seco (levedura comercial), por causa da alta taxa de conversão dos açúcares.

O mesmo comportamento apresentado nos resultados dos SS residuais pode ser visto no teor alcoólico das bebidas finais, onde as leveduras selvagens apresentaram valores mais similares entre si e maiores em relação à comercial, em especial a levedura LIC2 que obteve menor quantidade de SS e maior produção de etanol. Isso demonstra a interação que existe entre esses parâmetros, além de indicar que as leveduras selvagens utilizadas para a produção das bebidas de morango possuem maior eficiência que a comercial.

Em outros fermentados de fruta, Neves (2018) e Dangui (2019) obtiveram graduação alcoólica próximos com as bebidas produzidas neste trabalho, 11,3 (v/v) em fermentado de caju e 10% (v/v) em fermentado de melancia, respectivamente. Desse modo, a quantidade de álcool encontrado nas bebidas fermentadas de morango está de acordo com a legislação brasileira (4 a 14% (v/v)) (BRASIL, 2008), o que valida as bebidas como fermentados de fruta e com isso, comprova a eficiência fermentativa das leveduras avaliadas.

A determinação da acidez nas bebidas fermentadas é importante para caracterizar as condições que as leveduras estão expostas, além também de poder perceber possíveis alterações indesejáveis que ocorram no processo fermentativo (SILVA, 2011). Durante a produção das bebidas alcoólicas a acidez total foi influenciada pelos diferentes tratamentos, onde a levedura MAR11 apresentou comportamento semelhante à levedura comercial (Tabela 9). Porém, nas bebidas finais, a levedura MAR11 demonstrou uma diferença significativa das demais (Tabela

11), com um valor bastante elevado (4,31%), indicando um aumento da produção de ácidos no final da fermentação.

Tabela 9 - Médias da acidez (%) dos fermentados de morango durante a fermentação.

Tratamentos	Médias (%)
MAR11	3,23 a*
COMERCIAL	3,08 a
ACE2	2,63 b
LIC2	2,38 c

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Assim como a acidez, o pH também é parâmetro essencial para a estabilidade biológica das bebidas fermentadas alcoólicas (SILVA, et al., 2011). Esses indicadores se relacionam de acordo com a produção de ácidos orgânicos no mosto (CHIM; ZAMBIAZI; RODRIGUES, 2013). Na avaliação do pH, tanto o tempo como os diferentes tratamentos foram significativos ao longo do tempo. Na Figura 13 é possível observar uma grande oscilação do pH durante a fermentação, onde a levedura ACE2 se mostrou mais similar com a levedura comercial, enquanto as leveduras LIC2 e MAR11 apresentaram valores maiores. Apesar dessa oscilação ao longo da fermentação, o pH das bebidas se manteve na faixa entre 4,2 e 4,7, apontando estabilidade. Esse comportamento também pode ser observado durante a produção de fermentado de morango feito por Andrade et al. (2014), com levedura comercial, onde o pH variou ao longo da fermentação entre 3,27 e 3,42.

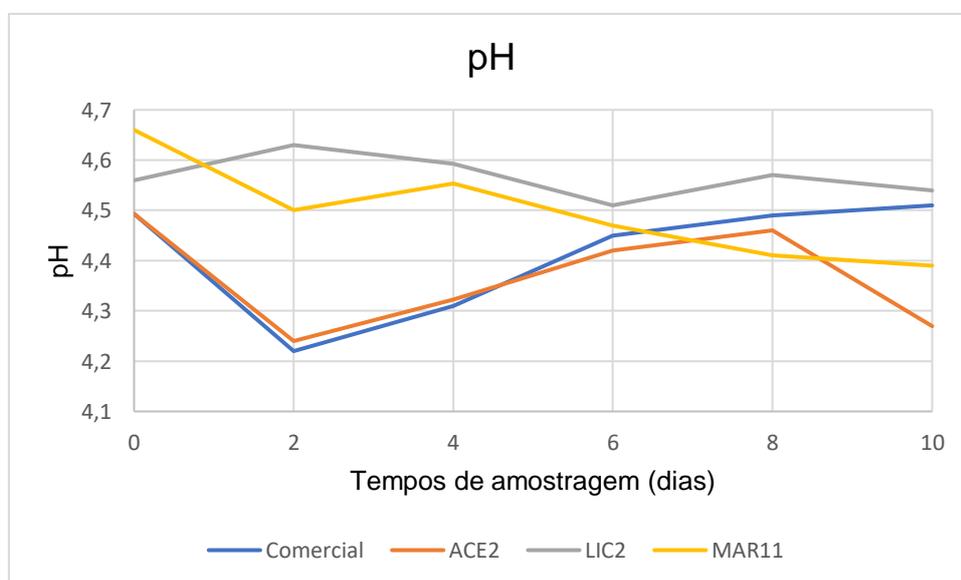


Figura 13. pH durante o período de fermentação das bebidas de morango.

A densidade consiste na relação entre a massa e o volume da bebida, sendo definida pela quantidade de etanol presente na amostra, que também está relacionada com a disponibilidade de açúcar no mosto. Assim, a densidade é resultante dos sólidos solúveis residuais presentes na bebida (SOCCOL et al., 2008). Em relação à densidade, as bebidas fermentadas de morango não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ao longo da fermentação, indicando desempenho semelhante, principalmente entre as leveduras selvagens (Tabela 10). Esse parâmetro também está correlacionado com o SS e o teor alcoólico, que é obtido a partir dos valores da densidade da bebida. Da mesma forma como ocorreu nas análises de SS e teor alcoólico, a densidade das bebidas com as leveduras selvagens também apresentaram semelhança, com menores valores, comparado com a levedura comercial (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias da densidade dos fermentados de morango durante a fermentação.

Tratamentos	Médias (g / cm⁻³)
LIC2	1,017 b*
MAR11	1,018 b
ACE2	1,020 ab
COMERCIAL	1,026 a

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Já em relação as bebidas finais, o pH e a densidade avaliados demonstraram que não houve diferença significativa entre os fermentados, indicando o mesmo comportamento entre as leveduras selvagens e comercial. Em comparação com a levedura comercial, as leveduras selvagens se mostraram eficientes em relação a esses parâmetros, que são importantes para avaliar as condições e o teor alcoólico da bebida.

Tabela 11 - Média das bebidas finais de cada tratamento.

Bebidas Finais	SST (%)	pH	Acidez (%)	Densidade (g / cm⁻³)	Teor alcoólico (%)
Levedura Comercial	5,8 a*	4,47 a	2,47 b	1,010 a	9,51 c

Levedura ACE2	4,6 b	4,38 a	2,69 b	1,004 a	10,32 b
Levedura LIC2	3,9 b	4,49 a	2,43 b	0,995 a	11,42 a
Levedura MAR11	4,0 b	4,37 a	4,31 a	1,000 a	10,77 b

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

5.3 Resultados da modelagem da produção de etanol

A modelagem da cinética da fermentação é essencial para escalonar da bancada até escala industrial (HISS et al., 2001). Como não foi realizada a quantificação da população de leveduras ao longo da fermentação, foi modelada somente a produção de etanol pelas leveduras selecionadas, que também se mostra relevante, considerando o produto final obtido. A Figura 14 apresenta a modelagem e simulação da produção de etanol utilizando o modelo de Monod (1980), onde foram aplicados os parâmetros μ_P e $\ln\mu_P$, visando um melhor resultado do modelo (Tabela 12).

Tabela 12. Valores dos parâmetros μ_P e $\ln\mu_P$ obtidos.

Tempo (dias)	Comercial		ACE2	
	μ_P	$\ln\mu_P$	μ_P	$\ln\mu_P$
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	3,327	-1,20197	3,260	-1,18173
4	2,138	-0,76003	1,938	-0,66183
6	1,481	-0,39279	1,516	-0,41578
8	1,150	-0,13976	1,223	-0,2009
10	0,951	0,050241	1,045	-0,04434
18	0,559	0,580869	0,607	0,49913
Tempo (dias)	LIC2		MAR11	
	μ_P	$\ln\mu_P$	μ_P	$\ln\mu_P$
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	2,353	-0,85583	3,350	-1,20896
4	1,935	-0,66011	2,038	-0,71172
6	1,539	-0,43106	1,599	-0,46966
8	1,313	-0,27225	1,290	-0,25464
10	1,141	-0,13191	1,077	-0,07418
18	0,672	0,397847	0,634	0,456449

Como pode ser observado na figura 14, os tratamentos contendo a levedura comercial, ACE2 e MAR11 apresentaram comportamentos mais semelhantes, onde os valores dos coeficientes de determinação (R^2) também se mostraram próximos,

principalmente entre a comercial e a levedura ACE2. Contudo, a levedura LIC2 foi a que melhor se ajustou ao modelo, apresentando maior coeficiente de determinação (0,992). Dessa forma, a levedura LIC2 foi a mais eficiente na produção de etanol entre os demais tratamentos.

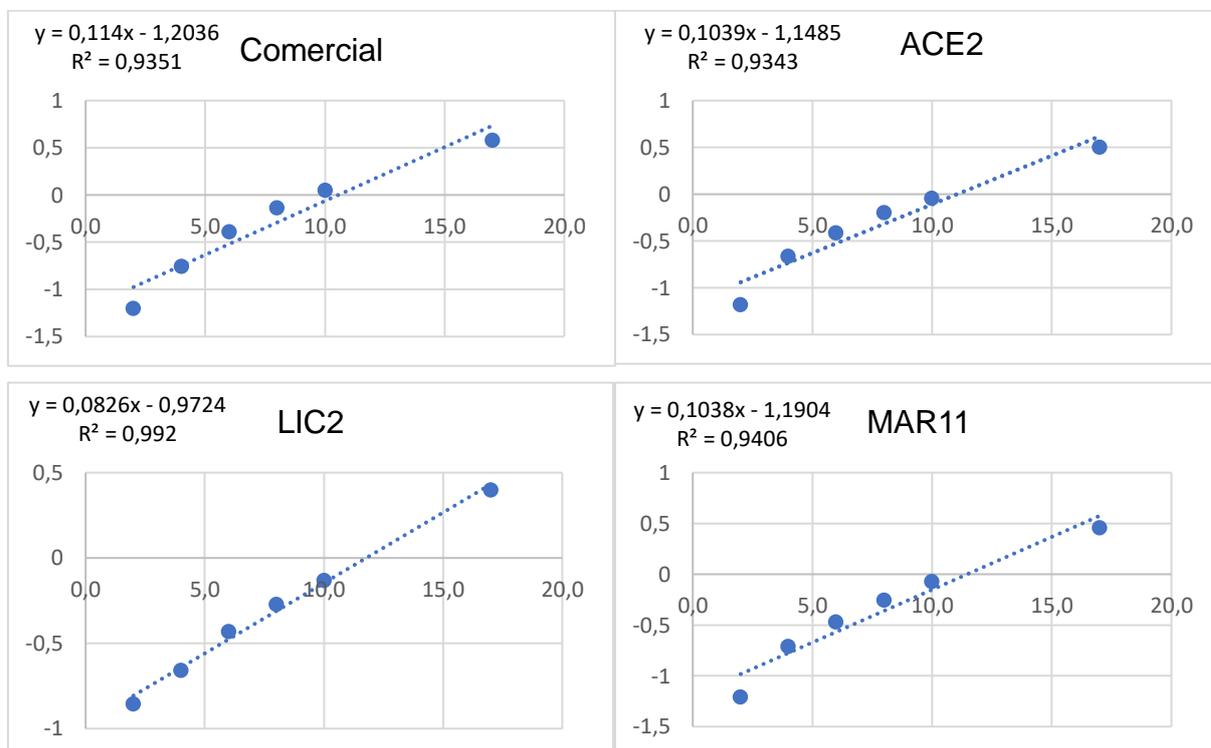


Figura 14. Modelagem da produção de álcool etílico durante a fermentação das diferentes leveduras. Fonte: autor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a elaboração do presente trabalho foi possível isolar e analisar o potencial fermentativo de leveduras selvagens, entre as quais a ACE1, ACE2, LIC2, MAR1, MAR3, MAR11, MAR22, MAR23 e UVA1, oriundos dos frutos acerola, licuri, maracujá da Caatinga e uva, se mostraram mais eficientes. A partir dessas leveduras, foi possível selecionar três e avaliar o processo fermentativo, comparando com a levedura comercial *Fermentis – w34/70*, utilizada em cervejaria local. Tais leveduras se mostraram eficientes sob as altas temperaturas da região semiárida (± 30 °C). Ainda, foi possível modelar a produção de álcool etílico obtido no processo fermentativo, onde a levedura LIC2 foi a que se mostrou mais eficiente seguindo o modelo de Monod.

Foram elaboradas quatro bebidas fermentadas de morango e realizada a sua caracterização. Tais bebidas demonstraram teor alcoólico entre 4 e 14% (v/v), como determina a legislação brasileira (BRASIL, 2008), o que classifica as bebidas como

fermentados de fruta. Os resultados físico-químicos das bebidas de morango indicam que estas possuem características similares a outros fermentados de fruta e se mostram satisfatórios, comprovando a eficiência fermentativa das leveduras selecionadas.

Dessa forma, torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de novos produtos, e conseqüentemente, o estudo de espécies do gênero *Saccharomyces* para aprimorar os processos fermentativos, aumentando a possibilidade de se obter produtos com novas características sensoriais e maior produtividade de acordo com as condições regionais.

REFERÊNCIAS

AFONSO, J. O álcool e a acidez dos vinhos. **Revista Adega**. Universidade do Vinho. 2019. Acesso em: <https://revistaadega.uol.com.br/artigo/o-alcool-e-acidez-dos-vinhos_6055.html>. Acessado em: 24 mar. de 2022.

AMARAKOON, I. I.; HAMILTON, C. L.; MITCHELL, S. A.; TENNANT, P. F.; ROYE, M. E. **Biotechnology Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies**, p. 549–563, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00028-7>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021040000287?via%3Dihub>.

ANDRADE, M. B., PERIM, G. A., SANTOS, T. R. T., MARQUES, R. G. Physical and Chemical Characterization of Strawberry Unfermented. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. Jan./Jul., v. 3, n. 1, p. 18-25, 2014. DOI 10.5433/2316-5200.2014v3n1p18.

ANDRIETTA, S. R. Modelagem, simulação e controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, simulação e controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANTUNES, L. E. C., BONOW, S. **Anuário Embrapa Campos e Negócios 2021: Morango**, p. 87 - 90 2021. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222342/1/Antunes-Anuario-HF-2021-pag-87.pdf>>. Acessado em: 22 mar. 2022.

ANTUNES, L. E. C., REISSER J.C. Fragole, i produttori brasilian imirano all'esportazione in Europa. *Frutticoltura* (Bologna), v. 69, p. 60-65. 2007.

AOAC - Association of Analytical Chemists. Official Methods of the Association of the Agricultural Chemists. 19th edition. Whashington, 2012.

AQUARONE, E. BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A. Tecnologia do Vinho. In: Aquarone, E. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos** (Volume 4). São Paulo: Edgar Blucher, 1ª edição, p. 21-67, 2001.

ARRUDA, A. R., CASIMIRO, A. R. S.; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 161 – 167, 2003.

ASLANKOOHI, E.; HERRERA-MALAVER, B.; REZAEI, M. N.; STEENSELS, J.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. Non-Conventional Yeast Strains Increase the Aroma Complexity of Bread. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. 1 – 18, 2016.

BARCELOS, A. C. A. Produção de etanol com uso de leveduras selecionadas em usinas associadas à Siamig. Trabalho de conclusão de curso. Universidade federal de ouro preto - Escola de Farmácia. Ouro Preto - MG. 2021.

BARNETT, J. A. The taxonomy of the genus **Saccharomyces** Meyen ex. Reess: a short review for non-taxonomists. *Yeast*, Sussex, v. 8, n. 1, p. 1-23, janeiro de 1992.

BARRE, P., BLONDIN, B., DEQUIN, S., FEUILLAT, M. SABLAYROLLES, J. M., ASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP. Universidade do Estado de São Paulo. 2004.

BASSANEZI, R. Modelagem Matemática. Blumenau: Dynamis, p. 389. 1997.

BRASIL (Leis e Decretos) – Decreto Federal nº 73.267 de 6 de dezembro de 1973. **Complementação dos padrões de identidade e qualidade – regulamentação geral de bebidas**. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de setembro de 1974. Seção I – Parte I, Suplemento ao nº 181, pp. 70-72.

BRASIL (Leis e Decretos) - Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008. **Regulamento Técnico para a Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a polpa de fruta**. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 abr. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 28 de nov. 1986. Seção 1, pt. 2.

CAMPBELL-PLATT, Geoffrey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri - SP: Editora Manole, 2015. 9788520448458. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788520448458/>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

CARVALHO, S.P. de. História e evolução da cultura do morangueiro no Brasil nos últimos 50 anos. **Horticultura Brasileira**, Viçosa, v. 29, n.2, 2011.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; RODRIGUES, R. S. Estabilidade da Vitamina C em Néctar de Acerola sob Diferentes Condições de Armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.4, p.321-327, 2013.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; RODRIGUES, R. S. Estabilidade da Vitamina C em Néctar de Acerola sob Diferentes Condições de Armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.4, p.321-327, 2013.

COPELLO, M. **Revista Veja** - Vinoteca. Rio de Janeiro – RJ. 2021. Disponível em: <<https://vejario.abril.com.br/coluna/vinoteca/vale-sao-francisco-vinhos-tropicais/>> Acesso em: 30 mar. 2022.

COSTA, R. T. R., SILVA, J. L., NASCIMENTO, A. M., SOUTO, M. V. Kinetics of mixed beverage production of honey from bees and strawberries. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V. 12, n. 1, p. 90-94, Pombal – PB, 2017.

DALSENTER, F. D. H., VICCINI, G., BARGA, M. C., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N. A. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochem**, 40. 801-807, 2015.

DANGUI, A. Z., SILVA, A. M., RANCHEL, B. V., KWIATKOWSKI, N., MULLER, S. B., LIMA, K. P. Elaboração de fermentado alcoólico de melancia (*Citrullus lanatus*) com própolis e verificação dos compostos fenólicos e antioxidantes. **Revista Mundi – Meio ambiente e agrárias**. Instituto Federal do Paraná.

DARÉ, R. M. Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 67 2008.

DE PAULA, B., CARVALHO FILHO, C. D., MATTA, V. M., MENEZES, J. S., LIMA, P. C., PINTO, C. O., CONCEIÇÃO, L. E. M. G. Produção e caracterização físico-química de fermentado de umbu. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9. 2012.

DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S.; PONTREMOLES, C.; SABATELLI, M.P. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 281–289, 2007.

DUARTE, Y. G., REZENDE, A. J., FORTES, R. C., PAZ, R. C., SILVA, B. N. Desenvolvimento e análise sensorial de sorvete de morango enriquecido com suplemento proteico (Whey Protein Isolado): um estudo experimental analítico. **Brazilian Journal of Development**, vol. 7, nº 8, p. 85185-85200 aug. Curitiba – PR. 2021.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. Lucknow: Ane books India, 2008.

EMBRAPA UVA E VINHO; Comunicado Técnico. Avaliação Nacional de Vinhos- Safra 2000: **Características Sensoriais e Físico-Químicas dos Vinhos**, 2000.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2014.

FAGUNDES, D. T. O.; SILVEIRA, M. L. R.; SANTOS, C. O.; SAUTTER, C. K.; PENNA, N. G. Fermentado alcoólico de fruta: uma revisão. Bento Gonçalves – RS. 2015.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/>> Acesso em: 24 mar. de 2022.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, p. 402. 2003. Disponível em: <<https://www.worldcat.org/title/novo-manual-de-olericultura-agrotecnologia-moderna-na-producao-e-comercializacao-de-hortalicas/oclc/709635494>>. Acesso em: 30 mar. 2022.

FRANCO, J. **Revista Jardins**. 2021. Disponível em: <<https://revistajardins.pt/morango-historia-propriedades/>>. Acesso em: 30 mar. 2022.

FRANCOSO, I. L. T. *et al.* “Alterações físico-químicas em morangos (*Fragaria anassa Duch.*) irradiados e armazenados”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 28(3), 614-619. ISSN: 2310-2799. 2008.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.R.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, n. 31, p. 535–569, 2007.

GOUVEIA, A. M. S.; CORREIA, C. V.; TAVARES, A. E.; EVANGELISTA, R. M.; CARDOSO, A. I. I. Qualidade de Raízes de Batata-Doce em Função da Adubação Nitrogenada e Conservação. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 10, n. 1, p. 57-64, 2014.

GOUVEIA, A. M. S.; CORREIA, C. V.; TAVARES, A. E.; EVANGELISTA, R. M.; CARDOSO, A. I. I. Qualidade de Raízes de Batata-Doce em Função da Adubação Nitrogenada e Conservação. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 10, n. 1, p. 57-64, 2014.

GUIMARÃES, T. M. Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. v. 2, cap. 6, p. 93-122, 2001.

JUDICE, V. M. M.; BAÊTA, A. M. C. Modelo empresarial, gestão de inovação e investimentos de venture capital em empresas de biotecnologia no Brasil. *Revista de Administração Contemporânea* 2005; 9(1): 171- 191. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rac/a/jWMz4t37hRcWPLfJmz5tKns/?format=pdf&lang=pt>>. Acessado em: 30/06/2022.

LEÃO, P. C. S., MARQUES, A. T. B., BARROS, A. P. A. Cultivares de videira para a elaboração de vinhos finos para o Submédio do Vale do São Francisco. **Embrapa**. Circular técnica 128. Petrolina – PE. 2021. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/225749/1/Cultivares-de-videira-CT-128-2021.pdf>> Acesso em: 22 mar. 2022.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. D. Produção de etanol. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimático** (Volume 3). São Paulo: Edgar Blucher, 1ª edição, p. 1-43, 2001.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M. et al. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, n. 458, p. 337-341, 2009.

LOBATO, F. S. Controle ótimo da fermentação alcoólica em reator batelada alimentada usando computação Bio-inspirada. **Revista Tema**, v. 16, n. 1, p. 45 – 54, 2015.

LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. Controle na fabricação de álcool. São Carlos, SP, Ed. UFSCar, 95 p., 2009.

LOPES, T. Isolamento e identificação de leveduras selvagens de *Citrus reticulata* com potencial para a fermentação de cervejas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, 2016.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia: ensino e divulgação. Rio de Janeiro, 2011.

MATOS, R. L. Q., GONZÁLEZ, O. Q., PARRA, R. C., MACÍAS, M. A. C., JOSIAS, A. F. S. Transformação do morango “festival” a doce determinação de parâmetros físicos e físico-químicos. **Revista Cubana de Química**, vol. 33, nº 3. Santiago de Cuba. 2021. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-54212021000300383&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 30 mar. 2022.

MENEZES, T. J. B. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141 – 178, 1980.

MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann e Cie. Paris, 1949.

MUNIZ, C. R., BORGES, M. F., ABREU F. A. P., NASSU, R. T., FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutas tropicais. B. CEPPA. 20; 2:309–322. 2002.

ELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2019. 9788582715345. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

NEVES, W. B. P. Produção, caracterização físico-química e análise sensorial de fermentados de caju desenvolvidos por técnicas distintas. Monografia de Bacharelado em Ciência e Tecnologia. Universidade Federal Rural do Semiárido. Pau dos Ferros - RN. 2018.

OIV – INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE, 2021. Disponível em: <<https://www.oiv.int/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2022.

OLIVEIRA, E. N. A., FERNANDES, A. V., ROCHA, E. M. F. F., FEITOSA, B. F., FREITAS, P. V. C. Cinética de fermentação de fermentado alcoólico misto de água de

coco e tamarindo. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia, Foz do Iguaçu, PR, 2016.

OLIVEIRA, V.A.; VICENTE, M.A.; FIETTO, L.G. *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Appl Environ Microbiol.*, n. 74, p. 693-701, 2008.

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

PHISALAPHONG, M., SRIRATTANA, N., TNATHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, n. 28, p. 36-43, 2006.

PIETROWSKI, G. A. M. Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para a produção de aromas em fermentado de maçã. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 2011.

PINHEIRO, M. S.; SOUSA, J. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.18; p. 2071-2082, 2014.

QUINTÃO, A. L. C. Efeitos da radiação gama na qualidade de morangos cv. Albion. Dissertação de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, p. 19. Belo Horizonte. 2018.

RIBEIRO, B.; PEREIRA, K. S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, M. A. Z. **Microbiologia Industrial - Alimentos - Volume 2**. Rio de Janeiro - RJ: Grupo GEN, 2018. 9788595152151.

RIOS, A. Vale do São Francisco: como a pandemia alterou o consumo de vinho e as dinâmicas na região. Folha de Pernambuco. 2021. Disponível em: <<https://www.folhape.com.br/economia/vale-do-sao-francisco-como-a-pandemia-alterou-o-consumo-de-vinho-e-as/186130/>> Acesso em: 25 mar. 2022.

RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BERNARDO, A.; BADINO, A. C. Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂ stripping for bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 132, p. 77-88, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876217306974>.

RONQUE, E.R.V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba: EMATER-PR, 1998. 206p.

RUSTICK, T. M., BECKER, T. A. G., BAVARESCO, D. Modelagem matemática da fermentação alcoólica do vinho a partir da dinâmica populacional de *Saccharomyces cerevisiae*. Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica. Instituto Federal do Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves – RS. Novembro de 2019.

SANTOS, D. G. M. Monitoramento de insetos na cultura do morango no curimataú paraibano. Pós-graduação em gestão dos recursos ambientais do semiárido. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba. Pícuí – PB. 2021.

SCHMIDELL, W., AQUARONE, E., BORZANI, W., LIMA, U. A. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, W. et al (Coord.). **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica** (Volume 2). São Paulo: Edgar Blucher, 1ª edição, p. 179-192, 2001.

Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Olericultura: cultivo do morango** / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. - Brasília: Senar, 2019.

SILVA, M. E., NETO, A. B. T., SILVA, W. B., SILVA, F. L. H., SWARNAKAR, R. Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 24, n. 2, p. 163-169, abr. 2007.

SILVA, N. S., SILVA, B. A., SOUZA, J. H. P., DANTAS, V. V., REIS, K. B., SILVA, E. V. C. Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir do suco de manga rosa (*Mangifera indica* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR - Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil ISSN: 1981-3686/v. 05, n. 01: p. 367-378, 2011.

SILVA, N. S.; SILVA, B. A.; SOUZA, J. H. P.; DANTAS, V. V.; REIS, K. B.; SILVA, E. V. C. Elaboração de Bebida Alcoólica Fermentada a partir do Suco de Manga Rosa (*Mangifera Indica* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, n. 01, p. 367-378, 2011.

SILVA, R., LAGO-VANZELA, E., BAFFI, M. A. **Uvas e Vinhos: química, bioquímica e microbiologia**. 1ª edição. São Paulo: Editora Unesp, Editora Senac, 2015.

SMITH, A. Como calcular o teor alcoólico do vinho. Ehow Brasil. 2021. Disponível em: <https://www.ehow.com.br/calcular-teor-alcoolico-vinho-como_43864/>. Acesso em: 15/07/2022.

SOCOL, M. C. H.; IDE, G. M.; SILVA, L. C.; FICAGNA, P. R. Comparação de parâmetros físico-químicos durante a vinificação de uvas Cabernet Sauvignon, produzidas em Lages e São Joaquim. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, n.1, p. 54-60, 2008.

SONEGO, J. L. S., LEMOS, D. A., PINTO, C. E. M., CRUZ, A. J. G., BADINO, A. C. Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO₂ Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling. **Energy Fuels** 2016, n. 30, p. 748-757, São Carlos – SP. 2016.

SOUZA, E. B. de. Importância da classificação, embalagem e rotulagem de morango na comercialização. In: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, A. F. (Org.). **Como produzir morangos**. Curitiba: UFPR, 2014, p. 15-31.

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E. *et al.* Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology*, n. 38, p. 947-995, 2014.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, p. 61-80, 2014.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 113-119, 1993.

VENTURINI, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. 2ª edição. São Paulo: Blucher, 2016.

VICENZI, R. *Biotecnologia de alimentos*. Ijuí, 2011.

VIEIRA, R. C. **Estudo da modelagem cinética da fermentação alcoólica em batelada de polpa de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*)**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Centro de Tecnologia. Universidade Federal de Alagoas. Maceió – AL. 2020.

WANG, Q.M.; LIU, W.Q.; LITI, G. *et al.* Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in *natural* environments remote from human activity. *Mol Ecol.*, n. 21, p. 5404-5417, 2012.

WHITE, C., ZAINSCHEFF, J. *Yeast: the practical guide to beer fermentation*. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2010.

ZANARDI, M. N. **Modelagem e simulação da fermentação alcoólica em batelada e contínua com múltiplos reatores em série**. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre - ES. 2016.