

**Ensino Médio com Habilitação Profissional de
TÉCNICO EM QUÍMICA**

**Programa de Articulação da Formação Profissional
Média e Superior (AMS)**

Priscila Pinheiro de Lima
Sofia Helena Cruz
Yasmim Lourenço da Conceição

**VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS NO
MOSTO A PARTIR DE FERMENTOS DISTINTOS**

Priscila Pinheiro de Lima
Sofia Helena Cruz
Yasmim Lourenço da Conceição

VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS NO MOSTO A PARTIR DE FERMENTOS DISTINTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Técnico em Química da escola ETEC Cel. Fernando Febeliano da Costa, orientado pelo professor Wagner Fernando Ferreira, como requisito parcial para a obtenção do título de Técnico em Química.

Piracicaba – SP

2024

Priscila Pinheiro de Lima
Sofia Helena Cruz
Yasmim Lourenço da Conceição

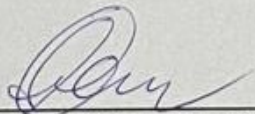
VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS NO MOSTO A PARTIR DE FERMENTOS DISTINTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso Técnico em Química da escola ETEC Cel.
Fernando Febeliano da Costa, orientado pelo
professor Wagner Fernando Ferreira, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Técnico em Química.

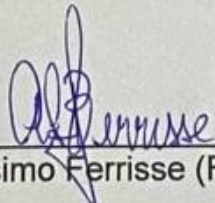
APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA



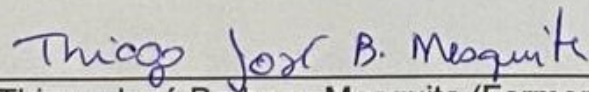
Prof. Wagner Fernando Ferreira
Coordenador da Área e Presidente da Banca Examinadora



Dra. Silene Cristina de Lima Paulillo (Fermentec) – Examinadora



Dr. André Luís Bellíssimo Ferrisse (Fermentec) – Examinador



Dr. Thiago José Barbosa Mesquita (Fermentec) – Examinador

Piracicaba – SP

2024

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Etec Cel. Fernando Febeliano da Costa pelo apoio e incentivo durante toda a nossa jornada acadêmica, proporcionando uma base sólida de conhecimento. Nossos sinceros agradecimentos também aos professores orientadores, cuja orientação e dedicação foram essenciais para a realização deste trabalho. Estendemos nossa gratidão à Fatec, Faculdade de Tecnologia de Piracicaba, por disponibilizar os laboratórios e equipamentos necessários, viabilizando a realização das análises e experimentos que enriqueceram este projeto. Sem o apoio e estudo, este TCC não teria sido possível.

Por fim, um agradecimento especial à Vanessa Costa da área microbiológica da Fermentec, por ter nos auxiliado na etapa final do nosso trabalho e no desenvolvimento da metodologia prática.

" Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para a humanidade."
(Louis Pasteur)

RESUMO

No presente trabalho foram analisados e avaliados seis mostos com o intuito de deparar com maneiras mais seguras e viáveis de realizar uma fermentação alcoólica com a finalidade de entender o comportamento e a resistência das leveduras durante o processo fermentativo. Para isso, aplicou-se o método de plaqueamento com ágar YPDA, que permitiu a contagem e análise das células nas amostras. Os mostos não foram preparados em ambiente estéril para posterior contagem de colônias, porém ainda assim foi possível analisar e obter resultados significativos. A análise dos resultados demonstrou que a viabilidade das leveduras varia de acordo com o tipo de fermento utilizado nas amostras, indicando que cada um obtém sua resistência e adaptabilidade ao ambiente do mosto, o que impacta diretamente na qualidade e rendimento do processo fermentativo. Conclui-se que a escolha do fermento adequado é essencial para otimizar a produção e garantir uma fermentação eficiente.

Palavras-chave: leveduras, fermento, viabilidade.

ABSTRACT

In the present work, six worts were analyzed and evaluated with the aim of finding safer and more viable ways to carry out alcoholic fermentation in order to understand the behavior and resistance of yeasts during the fermentation process. The YPDA agar plating method was used to count and analyze the cells in the samples. The musts were not prepared in a sterile environment for subsequent colony counting, but it was still possible to analyze and obtain significant results. Analysis of the results showed that yeast viability varied according to the type of yeast used in the samples, indicating that each has its own resistance and adaptability to the wort environment, which has a direct impact on the quality and yield of the fermentation process. It can be concluded that choosing the right yeast is essential to optimize production and ensure efficient fermentation.

Key words: yeasts, leaven, viability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Justificativa.....	11
1.2. Problema de Pesquisa	12
1.3. Hipóteses	12
1.4. Objetivo geral.....	12
1.5. Objetivos específicos.....	12
2. DESENVOLVIMENTO	12
2.1. Fundamentação Teórica	12
2.1.1. Cana-de-açúcar.....	12
2.1.2. Fermentação Alcoólica	13
2.1.3 Fermentação in natura.....	14
2.1.4.2.1 Fermento CA-11.....	17
3.1. Metodologia	20
3.1.1. Fermentação Alcoólica	21
3.1.1.1. Materiais e reagentes	21
3.1.1.2. Procedimento.....	22
3.1.2. Plaqueamento das Leveduras	27
3.1.2.1. Materiais e reagentes	27
3.1.2.2. Procedimento.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e de bebidas. Ela é essencial para a produção de produtos como cervejas, vinhos e outros fermentados. Durante esse processo, leveduras – microrganismos da classe dos fungos – convertem os açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono. Além disso, produzem outros compostos que influenciam as características sensoriais e qualitativas do produto final.

A viabilidade das células de leveduras no mosto é um fator determinante para o sucesso da fermentação. Esse aspecto impacta diretamente o rendimento e a qualidade da produção (AGOSTINI, 2020). Cada tipo de fermento utilizado pode conter cepas de leveduras com diferentes capacidades de resistência e adaptabilidade ao ambiente fermentativo. Essas características variam conforme fatores como a composição do mosto, a temperatura, o pH e a concentração de nutrientes disponíveis (LIMA, 2024).

Diante disso, torna-se relevante analisar a viabilidade das células de leveduras em diferentes condições e tipos de fermentos. O objetivo é identificar quais apresentam melhor desempenho para otimizar o processo de fermentação. Para tanto, este trabalho propõe investigar a viabilidade das células de leveduras no mosto utilizando fermentos distintos. O método de plaqueamento em ágar YPDA será aplicado para a contagem e análise das células viáveis.

A partir dos resultados obtidos, espera-se compreender melhor o comportamento e a resistência das leveduras em cada tipo de fermento. Assim, será possível fornecer subsídios para a escolha mais assertiva de cepas. Isso poderá contribuir para a melhoria dos processos fermentativos em escala industrial.

1.1. Justificativa

Atualmente, o processo de fermentação alcoólica é lento e ocorre predominantemente a contaminação do mosto por compostos secundários. Pensando nessa problemática a idéia foi melhorar a produção da água ardente fazendo com que o processo seja mais rápido e entender porque ocorre a alteração do mesmo em diferentes temperaturas, tempo e a qualidade do fermento.

1.2. Problema de Pesquisa

Levando em consideração a viabilidade de custo e tempo, a presente pesquisa reúne vários exemplos coletados no intuito de responder ao problema de pesquisa: "Como podemos equilibrar a relação entre custo, tempo e qualidade do mosto na escolha do fermento mais eficiente, considerando não apenas a velocidade de fermentação, mas também o desempenho das células no processo fermentativo?"

1.3. Hipóteses

Tendo a problemática do desempenho das células no processo fermentativo, e observando a eficiência de diferentes fermentos em determinada temperatura e tempo, a principal hipótese básica levantada por essa pesquisa é que: O equilíbrio entre os custos, tempo e a qualidade do mosto podem ser solucionados a partir de testes e pesquisas para selecionarmos a melhor forma de produzir bebidas alcoólicas através da destilação e a hipótese secundária é que após desenvolvermos uma produção eficaz com todas as exigências, a bebida deve estar apta para o consumo.

1.4. Objetivo geral

Observar a viabilidade das células de leveduras no mosto a partir da utilização de fermentos distintos.

1.5. Objetivos específicos

- Melhorar a produção fazendo com que o processo seja mais eficiente;
- Entender porque ocorre a alteração do mosto em diferentes temperaturas, tempo e a qualidade dos diversos fermentos estudados

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Fundamentação Teórica

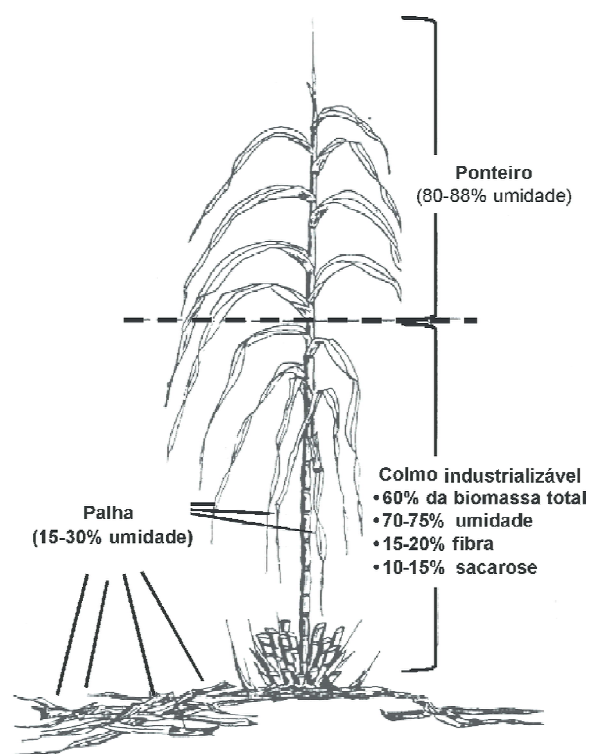
2.1.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta de origem asiática e é uma das matérias primas mais importantes para a produção de bebidas (LIPPMAN, 1941).

A planta é um insumo abundante e de baixo custo no mercado brasileiro, o que viabiliza a produção de etanol em grande quantidade para várias criações, como o combustível automotivo e até mesmo a fermentação alcoólica para o consumo humano (SARAIVA; ANITA; SUELI, 2006).

No Brasil a produção de álcool é praticamente exclusiva da fermentação de mosto que é composto por caldo de cana, melaço ou até mesmo pela mistura de ambos. Para completar as insuficiências do caldo alguns macronutrientes e/ou micronutrientes também podem ser adicionados (SILVA et al., 2006).

Figura 1 - Cana de açúcar

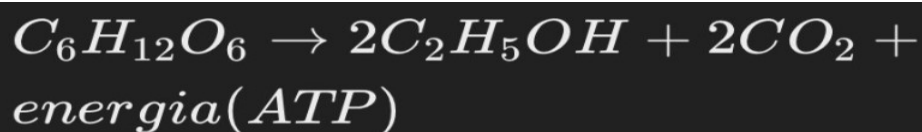


FONTE: <https://l1nq.com/nAPhn>

2.1.2. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é a principal etapa para a preparação de bebidas fermentadas, podendo ser preparadas com diversas leveduras (BARRE et al., 2000) como milho e abacaxi. Ela tem como resultado a formação de álcool, anidrido carbônico e alguns componentes secundários, eles são obtidos a partir da ação de leveduras que utilizam os açúcares do mosto para o seu desenvolvimento (LIMA et al., 2001).

Figura 2 Reação geral da fermentação alcoólica



Fonte:autoral

O estado ambiental em que a levedura se situa influencia os produtos finais da metabolização do açúcar, uma grande parte é convertida em etanol e CO_2 pela anaerobiose e a outra é modificada em novas células (LIMA et al., 2001).

Alguns fatores são necessários para que ocorra uma boa multiplicação das células durante a fermentação alcoólica e as suas necessidades nutricionais devem ser atingidas, assim permitindo a sua reprodução, é muito importante ressaltar que as leveduras precisam ter uma ótima ação na transformação da sacarose em etanol (SCHWAN E CASTRO, 2001). A quantidade de carboidrato no mosto pode atrapalhar na concentração celular e na produção do álcool, pois a concentração de açúcar precisa necessariamente aumentar de acordo com a medida que a concentração celular cresce (CARDOSO, 2006).

A temperatura é um fator essencial para que a fermentação alcoólica ocorra de maneira eficaz, a variação de $25^\circ C$ a $33^\circ C$ é considerada a melhor

para ter um alto rendimento e ajuda a diminuir as perdas pela evaporação (AQUARONE et al., 1983).

Figura 3 - Mostos Fermentando



FONTE: Aatoria própria

2.1.3 Fermentação in natura

A fermentação in natura é uma técnica de análise que consiste em identificar microorganismos presentes no caldo de cana e observar se eles são viáveis para a produção de Água Ardente. Para essa análise precisamos medir o BRIX antes do processo fermentativo (SILVA; DAMASCENO; SILVA; MADRUGA; SANTANA, 2008) para verificarmos o quanto de açúcar ele contém, para isso precisamos de um refratômetro.

Figura 4 - Refratômetro



FONTE: <https://l1nq.com/NePQh>

A cana utilizada na fermentação tem que ser cultivada de preferência sem

a presença de agrotóxicos, pois eles podem causar a contaminação do caldo fazendo com que o processo de fermentação não ocorra da forma desejada. A prática de queimar a cana na colheita pode contaminar com HPAs, mas isso não significa que o produto final (açúcar ou álcool) também esteja contaminado pois se seguir certo o processo de limpeza que o caldo é submetido é eficaz para a redução da contaminação (TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007).

2.1.4 Processo de fermentação com milho

A fermentação com milho consiste em utilizá-lo como levedura para a produção da Água Ardente assim ajudando no processo fermentativo do mosto a base de caldo de cana.

O milho é amplamente utilizado devido à sua disponibilidade e custo-benefício, sendo uma fonte rica em amido que pode ser convertido em açúcares fermentáveis (Jones & Clark, 2019).

2.1.4.1 Milho cru

A fermentação com o milho cru é uma técnica em que se utiliza o grão de milho fresco para servir como levedura. Para que isso ocorra retiramos todo o milho da espiga com o auxílio de uma faca e armazenamos em um recipiente para que possamos fazer as análises necessárias no mosto antes de despejá-lo.

Figura 5 - Milho retirado da espiga



FONTE: Autoria própria

Após as análises terem sido realizadas colocamos o milho no mosto e mantemos o mesmo a temperatura ambiente para que o milho possa fazer o seu trabalho no processo fermentativo.

Figura 6 - Mosto de caldo de cana com o milho verde cru



FONTE: Autoria própria

2.1.4.2 Milho com fermento CA-11

O processo fermentativo da Água Ardente com o milho cozido consiste em preparar a levedura (milho) um dia antes de colocar para fermentar. Primeiro bate-se no liquidificador o milho verde com água e logo após adiciona-se um pouco de açúcar e amorna bem, depois coloca um pouco do fermento CA-11 (desenvolvido pelo Instituto Agronômico de Campinas e a patente é do Rio Grande do Sul) e mantém em um lugar aquecido (forno) para que o fermento possa se desenvolver.

Figura 7 - Fermento de milho + CA-11

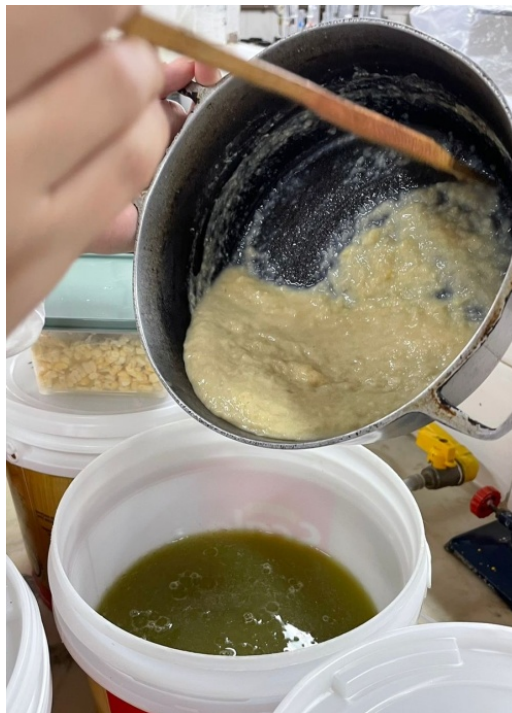


FONTE: Autoria própria

Após realizado esse procedimento depois de 24 horas se despeja aos poucos a mistura na garapa (caldo de cana) e deixa na temperatura ambiente

para que o mosto possa começar a fermentar.

Figura 8 - Mosto de caldo de cana com fermento de milho + CA-11



FONTE: Autoria própria

2.1.4.2.1 Fermento CA-11

A realização de um pé de cuba com linhagens de leveduras selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* tem garantido certa padronização na qualidade da bebida, pois essas apresentam capacidade de dominar a fermentação e diminuir as contaminações bacterianas (PATARO et al.; 2002; SOARES; SILVA; SCHWAN, 2011).

Outras características dessas leveduras é que reduzem as concentrações de açúcares residuais, aumentam a produtividade do processo, diminuem a competição por nutrientes essenciais e contribuem na qualidade, principalmente em relação aos teores de acidez e concentração de alcoóis superiores (ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012; DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2012).

Atualmente, a levedura selecionada *S. cerevisiae* CA-11 de característica floculante, é disponibilizada no Brasil na forma desidratada ativa, podendo ser utilizada prontamente para fermentação (CARDOSO, 2013).

Figura 9 - Fermento CA-11

FONTE: Autoria própria

CA-11 é ideal para produções pequenas, médias e grandes produções de cachaça; o início da fermentação é imediato, com aproveitamento quase total da sacarose presente no caldo de cana (hidrólise completa da sacarose com produção de glicose e frutose), baixa produção de ácidos e aldeídos, com sabor frutal e aroma.

Dados obtidos em alambiques que fazem uso dessa levedura, têm demonstrado um aumento significativo no rendimento, e melhorias nos teores de compostos aromáticos desejáveis (CARDOSO, 2013).

2.1.5 Abacaxi

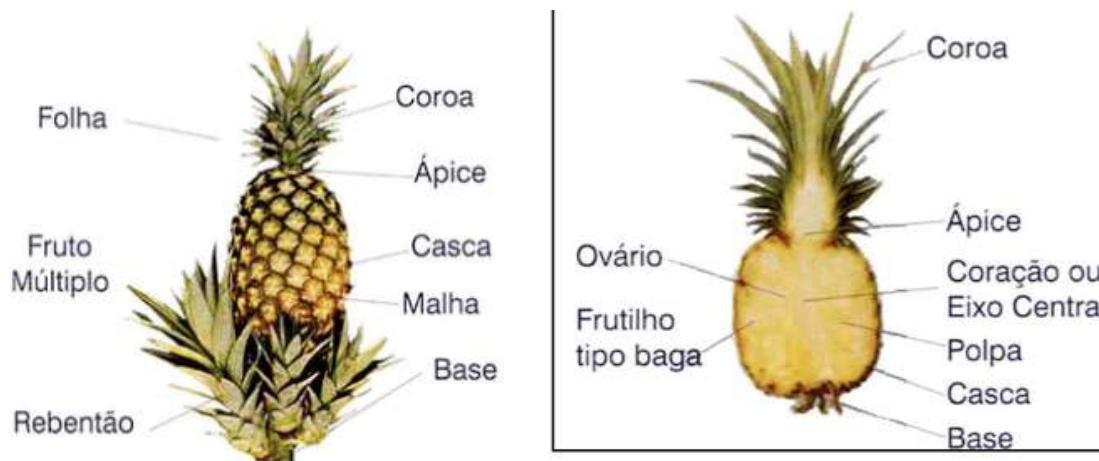
O abacaxi possui um sabor e uma fragrância muito específica por isso é uma fruta cítrica bastante popular, além dela possuir alto teor de açúcar o que é essencial para processos biotecnológicos como a fermentação alcoólica (BLEINROTH, 1978).

O abacaxizeiro é originário de regiões de clima quente e de distribuição pluvial bastante irregular, ele apresenta polpa de cor amarelada ou laranja avermelhado e normalmente possui um formato cilíndrico, a perda da cor verde que é presente na casca indica o seu amadurecimento pois ocorre a decomposição da clorofila através de transformação no pH, ativação da clorofilase e presença de sistemas oxidantes e o destaque dos carotenóides que são pigmentos de cor amarela e laranja. As variedades de abacaxi mais conhecidas são classificadas em cinco grupos distintos: Cayenne, Spanish, Queen, Pérola e Perolera (CUNHA; CABRAL, 1999; THE, 2001; CHITARRA; CHITARRA, 2005; EPSTEIN, 1999).

Foi comprovado em um estudo sobre a composição centesimal e de minerais em cascas de frutas, que as cascas das frutas possuem teor de

nutrientes superiores aos de suas partes comestíveis que são chamadas de polpa, essa parte pode ser considerada uma fonte alternativa de nutrientes (GUINDEM et al., 2005).

Figura 10 - Partes do Abacaxi



Fonte: FAEP (2008) apud FACUNDO, 2009.

2.1.6 Viabilidade das Células no Mosto:

A viabilidade das células de levedura em mosto é um fator determinante para a eficiência do processo fermentativo. A viabilidade pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a composição do mosto, as condições ambientais e a saúde das células de levedura.

- **Composição do Mosto:** O mosto contém açúcares, nutrientes e outros compostos que podem afetar a viabilidade das células de levedura. A presença de açúcares fermentáveis, como glicose e maltose, é essencial para o metabolismo das leveduras. Além disso, a presença de nutrientes como nitrogênio, vitaminas e minerais é crítica para a saúde e a proliferação das células (PAPAGEORGIOU et al., 2008). A composição do mosto deve ser monitorada para garantir que os níveis de nutrientes e açúcares estejam dentro da faixa ideal para a atividade da levedura (KURTZMAN et al., 2011).

- **Condições Ambientais:** A temperatura e o pH do mosto são fatores cruciais para a viabilidade das células. As leveduras têm faixas ótimas de temperatura e pH para crescimento e fermentação. Condições fora dessas faixas podem reduzir a viabilidade celular e afetar negativamente o desempenho da fermentação (FLEET, 2003).

2.1.7 Técnicas de Análise e Acompanhamento:

Para garantir a viabilidade das células de levedura e monitorar o progresso da fermentação, diversas técnicas analíticas podem ser empregadas:

- ***pH e Temperatura:*** O monitoramento contínuo do pH e da temperatura do mosto é importante para garantir que as condições estejam dentro da faixa ideal para a atividade das leveduras. Equipamentos como sensores de pH e termômetros são usados para medir e ajustar esses parâmetros conforme necessário (DUTCHER et al., 2004).

Figura 11 - pHmetro



FONTE: <https://l1nq.com/lrDGv>

Plaqueamento O plaqueamento de mostos é um método utilizado para quantificar a quantidade de microrganismos presentes em mostos, especialmente leveduras e bactérias. Esse método é essencial para garantir a qualidade e a segurança do produto final, como o vinho ou a cerveja (FUIZI, 2004).

Técnica "Spreader Plate"

É um método comumente empregado na análise de alimentos. Amostras de alimentos são maceradas e diluições do produto são pipetadas em placas de Petri esterilizadas contendo o meio de cultura requerida para a análises (SOUZA, 2010).

Após incubação, as colônias bacterianas são contadas em um contador de colônias que pode ser manual ou digital. (SOUZA, 2010).

Ágar Padrão para Contagem: É um meio de cultura utilizado para o plaqueamento de mostos. Ele contém nutrientes essenciais para o crescimento de microrganismos, como peptona, cloreto de sódio e ágar1.

A técnica consiste em, Peptona 10g, Cloreto de Sódio 5g, Ágar 15g, Água destilada 1L.

Diluição Seriada: Para realizar o plaqueamento, é necessário realizar diluições seriais do mosto para obter uma concentração adequada de microrganismos. A fonte do material de diluição (soluto) para cada etapa é proveniente do material diluído da etapa anterior. Em uma diluição em série, o fator de diluição total é o produto dos fatores de diluição em cada etapa. (SOUZA, 2010). Assim, se você tiver uma diluição 1/2, seu fator de diluição é 2, todas as diluições seguintes serão multiplicadas por 2. Para ter 1 mL de solução, como no exemplo abaixo, você terá a adição de 0,1 mL do concentrado mais 0,9 mL do diluente. Diluições em série são usadas para criar com precisão soluções extremamente diluídas, bem como soluções para experimentos que exigem uma curva de concentração com uma escala exponencial ou logarítmica (SOUZA, 2010). A técnica é útil quando há escassez do volume do concentrado ou do diluente, havendo necessidade de minimizar seu uso, ou quando há necessidade de diversas diluições, por exemplo, na determinação de um título ou na contagem de microrganismos. (SOUZA, 2010).

3.1. Metodologia

Realizou-se a fermentação alcoólica com o uso de leveduras e, em seguida, o plaqueamento das mesmas em ágar para verificar o crescimento e a viabilidade das colônias.

3.1.1. Fermentação Alcoólica

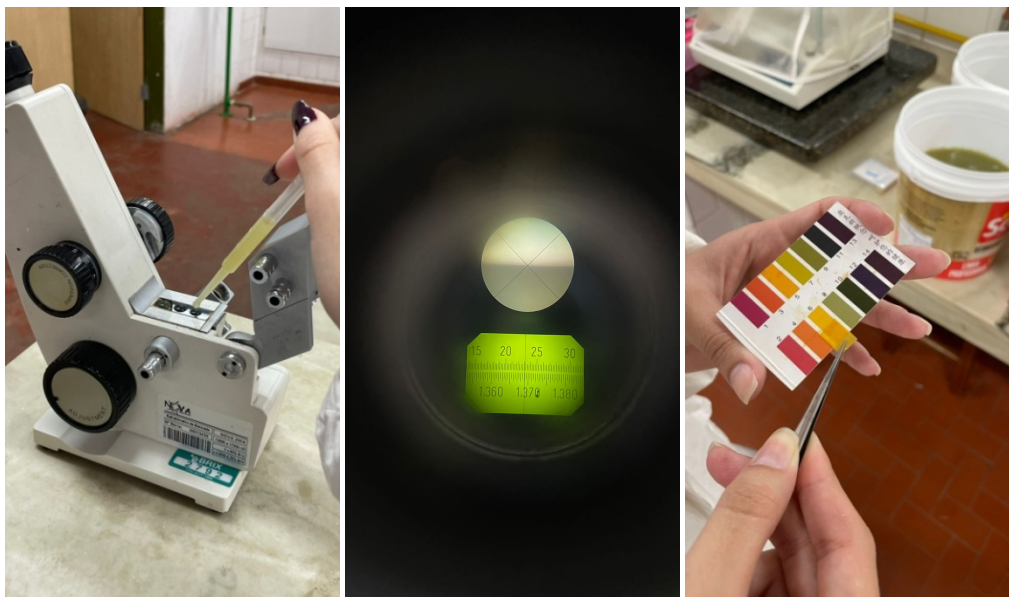
3.1.1.1. Materiais e reagentes

- Abacaxi (polpa/casca)
- Açúcar
- 6 Baldes de 2L
- 2 Beckers
- CA-11 LNF - *Saccharomyces cerevisiae*
- Caldo de cana
- 2 Colheres
- Fita de pH
- 1 Faca
- Frascos com amostra dos mostos
- 1 Fita de pH
- 1 Liquidificador Britânia
- Milho Verde KAILANNE
- Panos
- Pipeta de Pasteur (contagotas)
- Refratômetro de bancada NOVA 2WA
- Refratômetro de Bancada (Fatec)
- Termômetro

3.1.1.2. Procedimento

Inicialmente, separaram-se seis baldes e adicionaram-se 2 litros de caldo de cana em cada um. Mediram-se o Brix com o refratômetro e o pH com as fitas.

Figura 12, 13 e 14 refratômetro e fitas de pH



Fontes: autorais

Os dois primeiros mostos eram in natura, um ficou em temperatura ambiente e o outro foi refrigerado.

Figura 15 mostos in natura



Fonte: autoral

A levedura utilizada no terceiro e no quarto mosto foi o milho.

Figura 16 milho

Fonte: autoral

No terceiro balde com caldo de cana, adicionaram-se 200g de milho cortado direto da espiga, sem preparo adicional.

Figura 17 corte do milho

Fonte: autoral

A levedura do quarto mosto foi preparada um dia antes de ser adicionada ao caldo de cana; para isso, cortaram-se 200g de milho direto da espiga, que foi batido no liquidificador com 100mL de água. O milho batido foi levado ao fogo baixo, adicionou-se uma colher de sopa com aproximadamente 10g de açúcar e misturou-se; em seguida, acrescentou-se uma colher de café com aproximadamente 1,5g do fermento CA-11. Após 3 minutos no fogo baixo, tampou-se a mistura com papel-alumínio e ela ficou a 25°C por 12 horas, para

que ocorresse a fermentação. No dia seguinte, após a fermentação, a mistura foi adicionada ao caldo de cana e misturou-se bem.

Figura 18 e 19 mistura de milho com CA+11



Fontes: autorais

A levedura utilizada no quinto e no sexto mosto foi o abacaxi

Figura 20 corte do abacaxi



Fonte: autoral

O quinto mosto foi preparado apenas com a polpa do abacaxi, cortada em cubos e batida no liquidificador até ficar líquida; utilizou-se 300mL do suco e adicionou-se ao caldo de cana.

Figura 21,22 e 23 trituração do abacaxi sem casca e adição dele no mosto



Fontes: autorais

O sexto mosto foi preparado com a polpa e a casca do abacaxi; como a polpa possui bastante líquido, não foi necessário adicionar água para obter o suco. Assim, cortou-se o abacaxi inteiro, bateu-se no liquidificador e adicionaram-se 300mL do suco ao caldo de cana.

Figura 24,25 e 26 trituração do abacaxi com casca e adição dele no mosto.



Fontes: autorais

Após esse processo, os mostos foram mantidos em local adequado de acordo com o objetivo. Após uma semana, os mostos foram abertos e misturados, retiraram-se 5mL de amostra de cada um para medir o Brix e o pH.

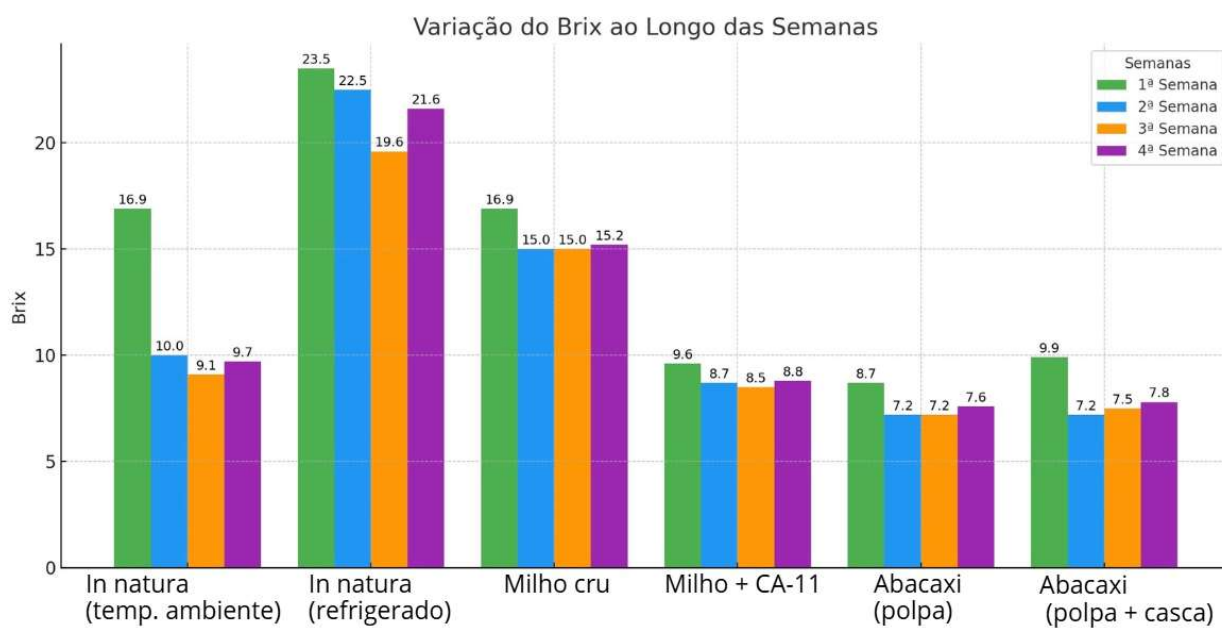
Figura 27 amostras dos mostos



Fonte: autoral

Os resultados do Brix e pH obtidos após quatro semanas foram:

Gráfico 1 Brix



Fonte: autoral

Gráfico 2 pH

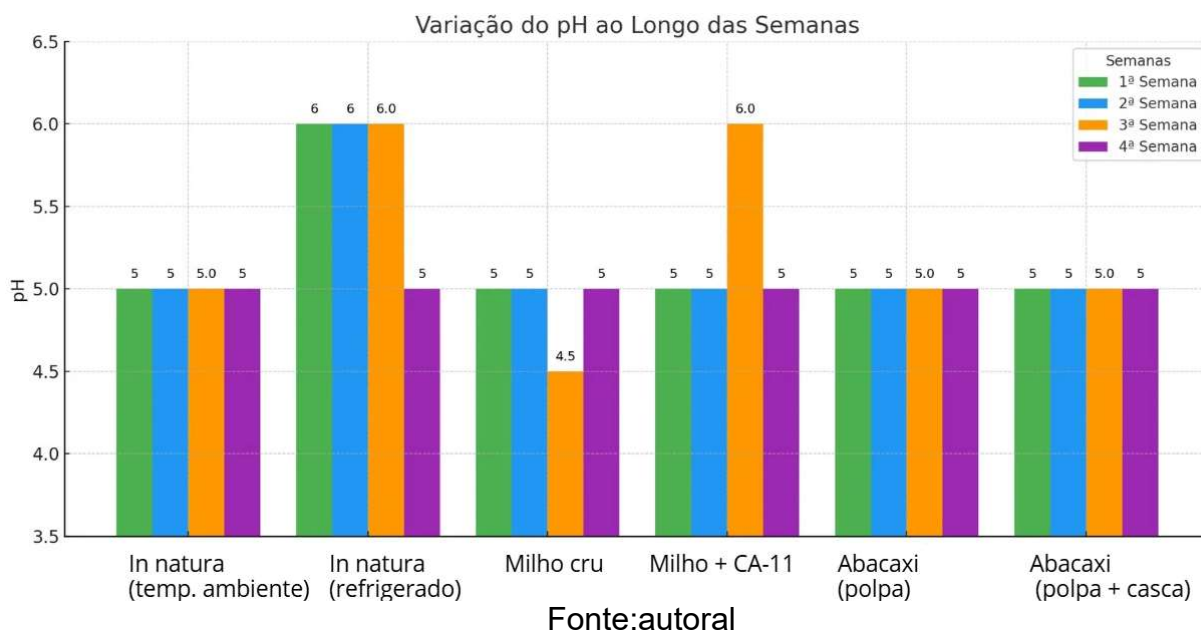
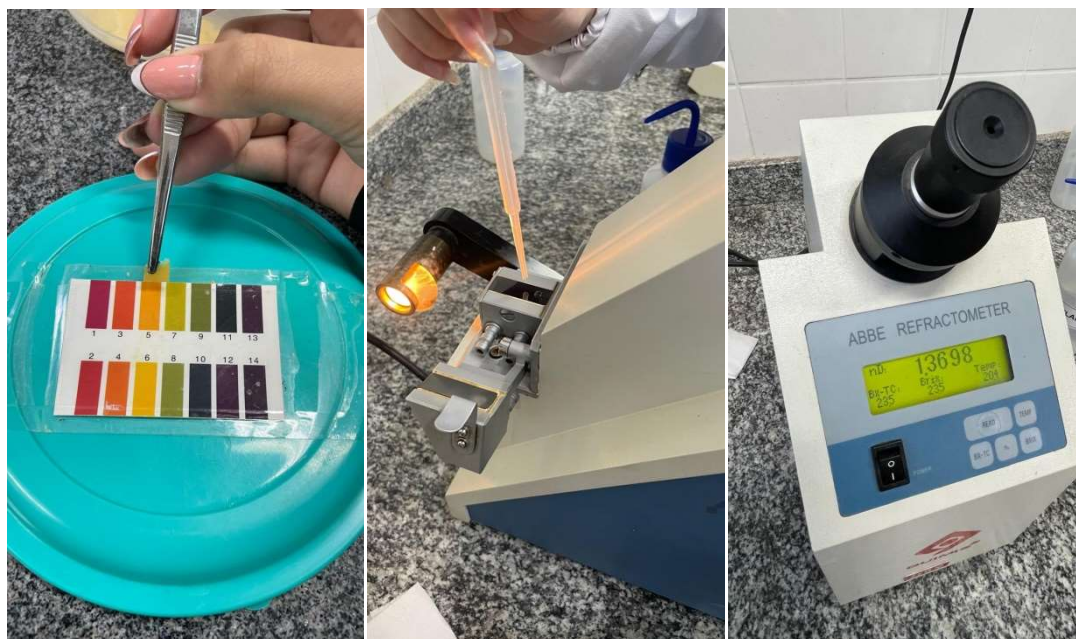


Figura 28,29 e 30 leitura de pH e análise no refratômetro



Fontes:autorais

3.1.2. Plaqueamento das Leveduras

3.1.2.1. Materiais e reagentes

- 1 Câmara de fluxo
- 1 Caneta Piloto
- 1 Pipetador automático
- 2 Tubos falcons
- Estufa
- Luva
- Microscópio Nikon Eclipse E200
- Placas de Petri
- Ponteiras
- Suporte para tubos de ensaio
- Tubos de ensaio

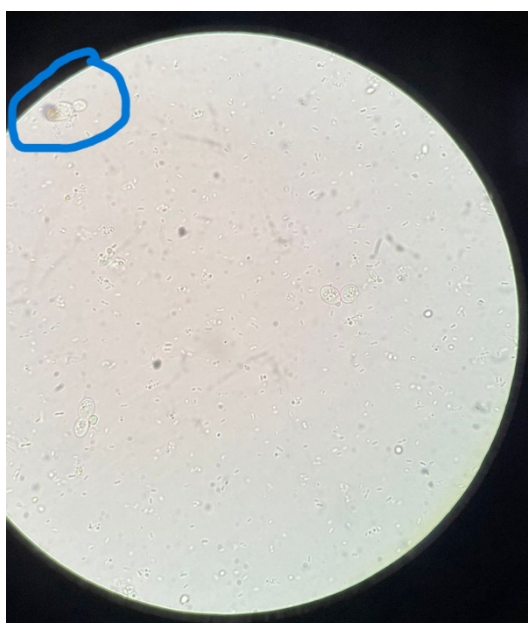
- YPDA

3.1.2.2. Procedimento

Após o processo fermentativo, foi o momento de analisar o mosto para avaliar qual apresentou o melhor processo de fermentação. Para isso, solicitou-se orientação a Vanessa, da área de microbiologia da Fermentec. Inicialmente, havia a intenção de realizar a contagem das células de cada mosto, mas Vanessa informou que isso seria inviável, pois, como os mostos não foram esterilizados antes do início do processo, muitos microrganismos estavam presentes, o que dificultaria a contagem.

No entanto, Vanessa sugeriu a realização de um plaqueamento de leveduras para possibilitar a contagem. O processo foi iniciado com a observação dos mostos no microscópio, a fim de obter uma ideia do que havia em cada um, e os resultados foram os seguintes.

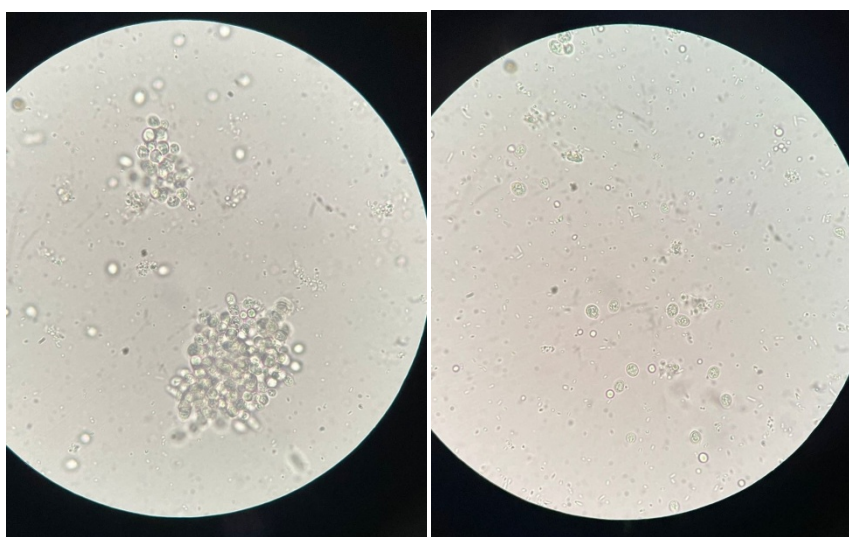
Figura 31 Mosto in natura frio:



Fonte: autoral

Na Figura 20, observa-se a presença de uma levedura no mosto.

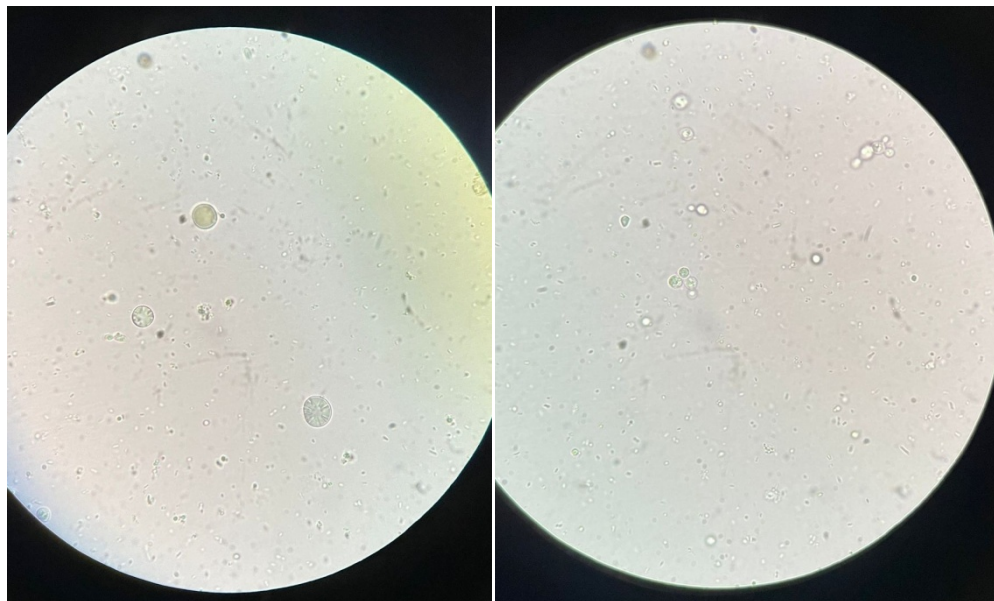
Figura 32 e 33 Mosto in natura temperatura ambiente:



Fontes: autorais

Na Figura 21, há a presença de cachos que podem conter leveduras, mas também microrganismos. Já na Figura 22, observam-se algumas leveduras soltas.

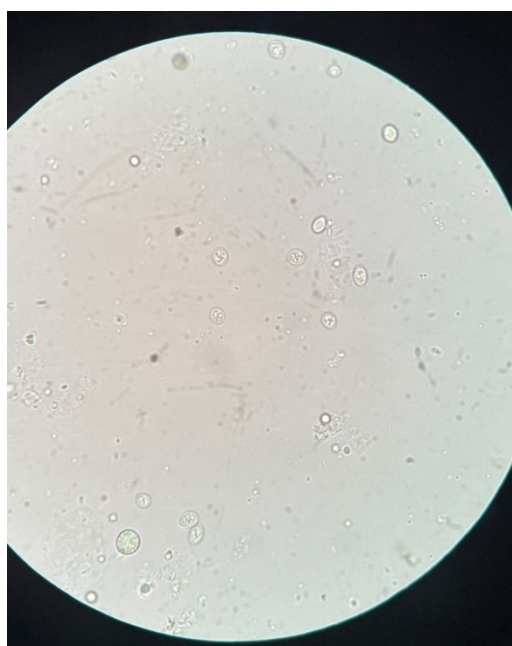
Figura 34 e 35 Mosto milho cru:



Fontes: autorais

Na Figura 23, o que parece ser uma estrutura celular é, na verdade, uma estrutura do milho (diferenciada pelo tamanho). Já na Figura 24, aparentam ser leveduras (diferenciadas pela estrutura).

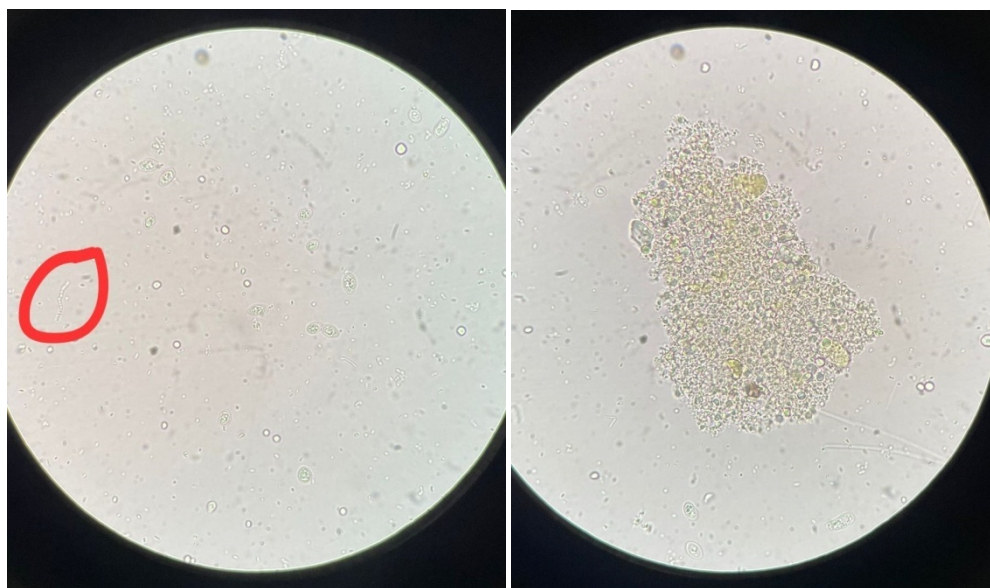
Figura 36 Mosto milho + CA-11:



Fonte: autoral

Na Figura 25, observam-se várias células de levedura.

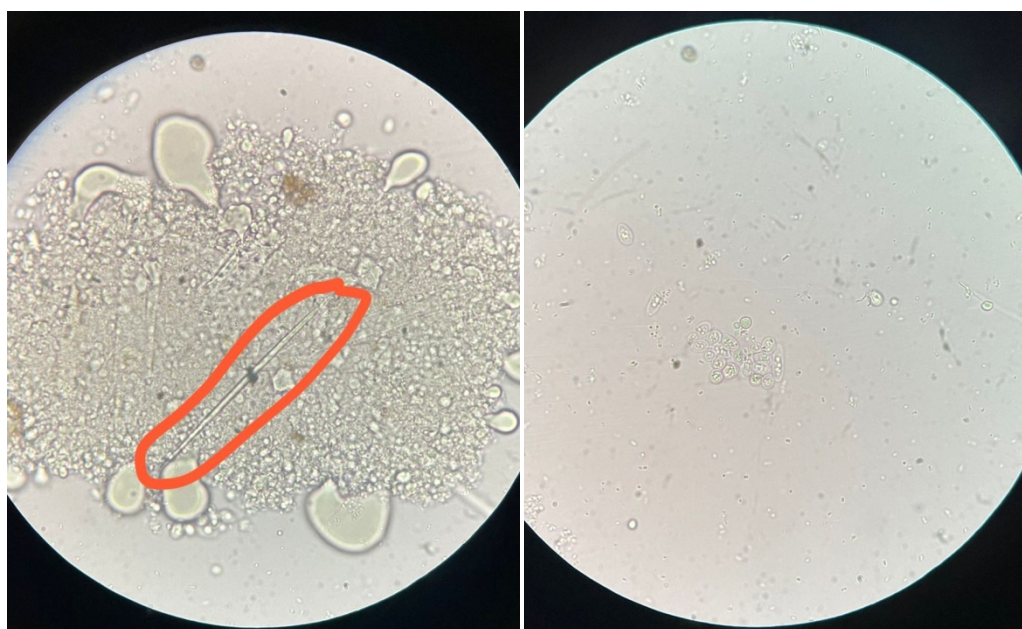
Figura 37 e 38 Mosto abacaxi casca+ polpa:



Fontes:autorais

Na Figura 26, o que está circulado é uma bactéria. Já na Figura 27, trata-se de uma fibra do abacaxi que contém outras estruturas junto com células de levedura.

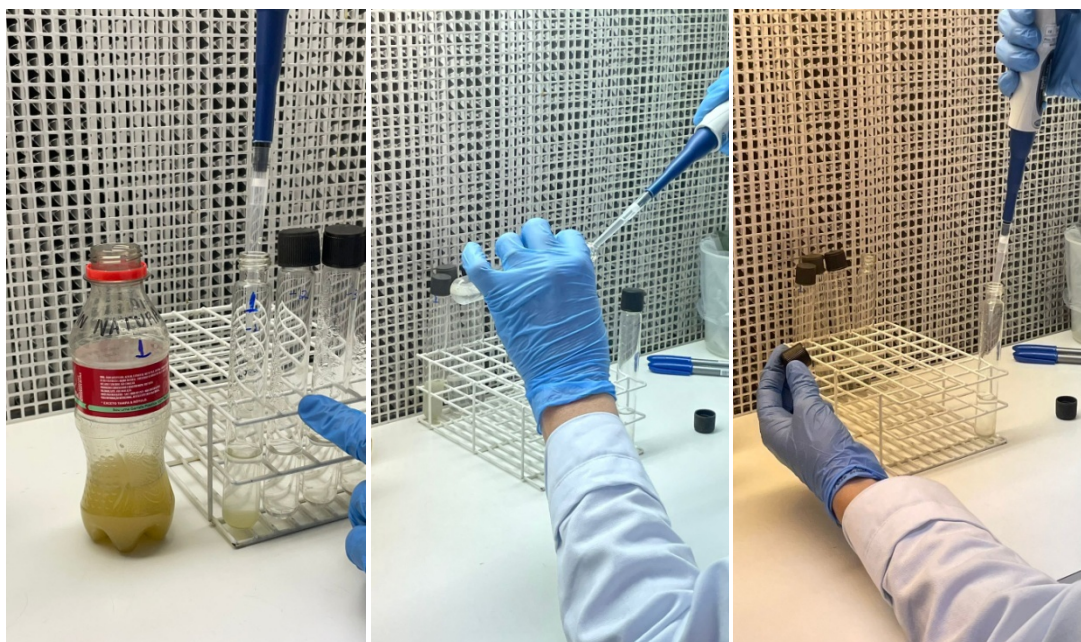
Figura 39 e 40 Mosto abacaxi polpa:



Fontes:autorais

Na Figura 28, observa-se uma fibra do abacaxi. Já na Figura 29, observam-se leveduras.

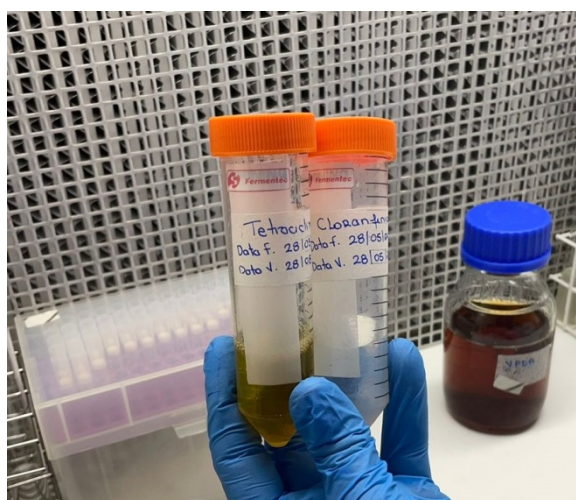
Após a observação de todos os mostos no microscópio, o material foi preparado para a realização do plaqueamento. Inicialmente, foi feita uma diluição seriada, de 10^{-1} até 10^{-5} .

Figura 41 processo da diluição seriada

Fontes: autorais

A diluição seriada foi realizada utilizando 1 mL da amostra e 9 mL de água peptonada. A mistura foi homogeneizada e, em seguida, 1 mL foi retirado e adicionado ao próximo tubo. Esse procedimento foi repetido até atingir a diluição desejada, que foi 10^{-5} .

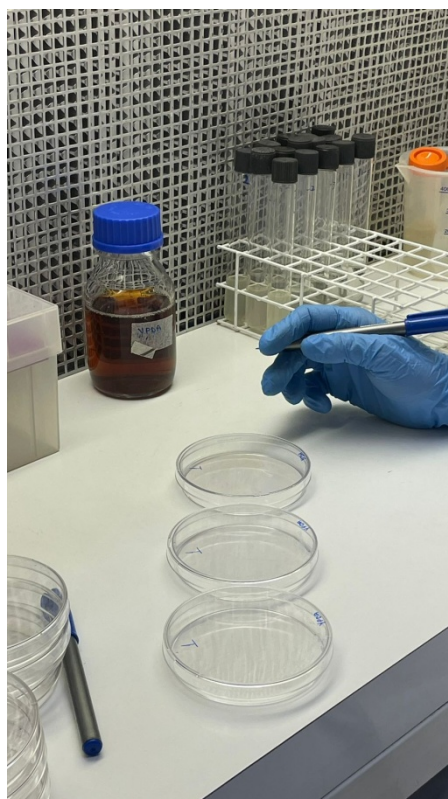
Em seguida, foi preparado o meio de cultura. O meio utilizado foi YPDA, com a adição de dois antibióticos, Tetraciclina e Cloranfenicol, para inibir o crescimento de bactérias, de forma que apenas as leveduras se desenvolvessem no meio de cultura.

Figura 42 antibióticos utilizados

Fonte: autoral

Para cada amostra de mosto, foram realizados três plaqueamentos com diluições diferentes: 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} .

Figura 43 placas de petri

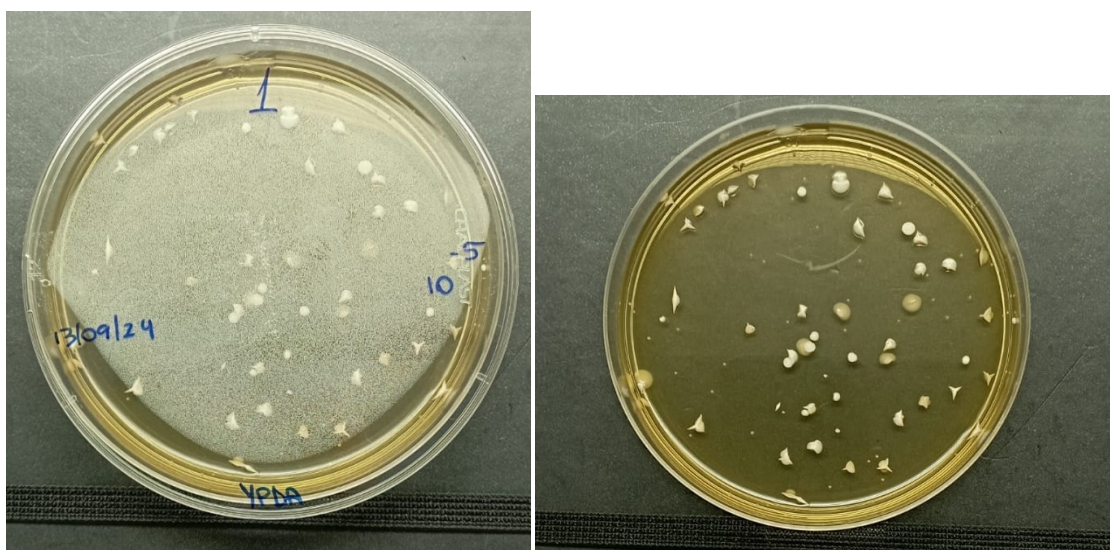


Fonte: autoral

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi citado na seção anterior desse trabalho, o plaqueamento foi realizado a fim de descobrirmos qual levedura tem mais eficiência para a realização de um processo fermentativo. Após uma semana obtivemos os resultados seguintes:

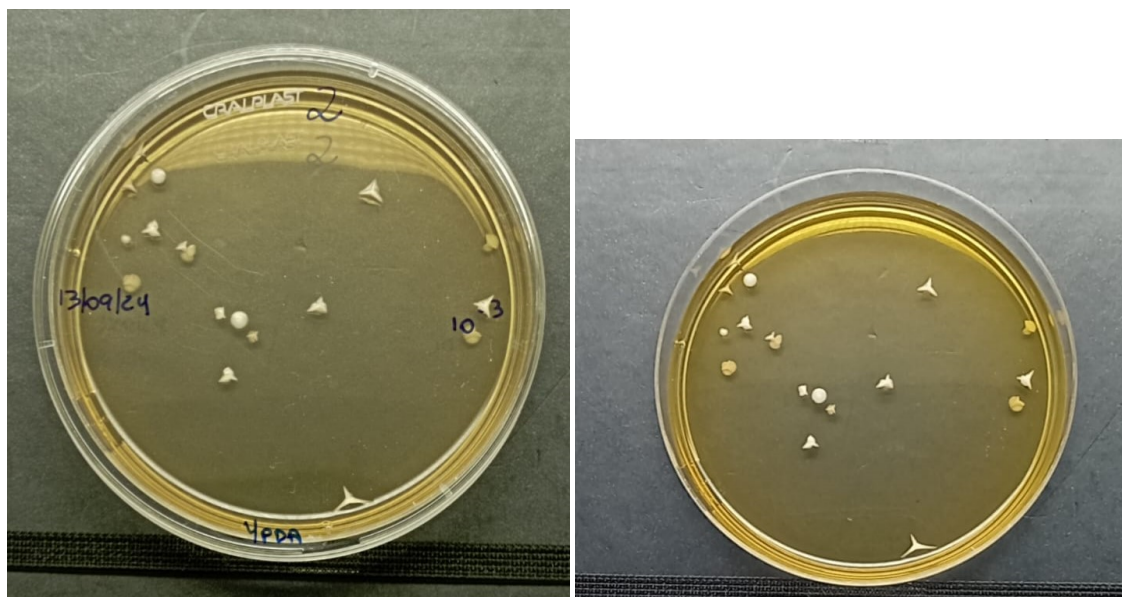
Figura 44 Mosto In Natura Frio



Fontes: autorais

Observa-se um grande crescimento de leveduras nesse plaqueamento.

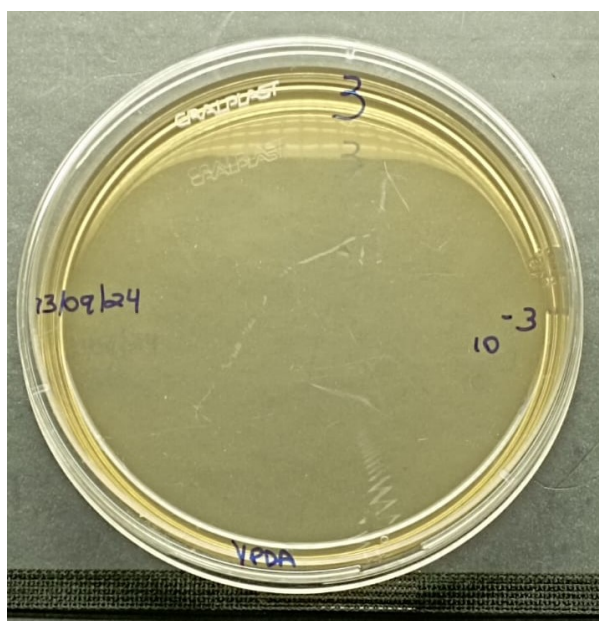
Figura 45 Mosto In Natura Temperatura Ambiente



Fontes: autorais

Esse plaqueamento obteve um crescimento mediano de leveduras, mas comparando com o anterior este foi menor.

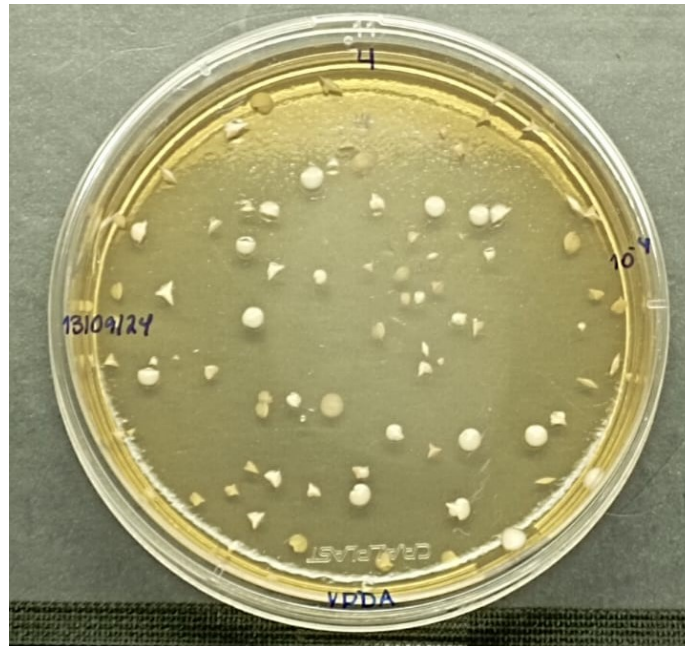
Figura 46 Mosto de Milho Cru



Fonte: autoral

Não obteve-se nenhum crescimento de levedura nesse plaqueamento. Segundo análises existe sim a presença de leveduras neste mosto porém em concentrações maiores que 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} .

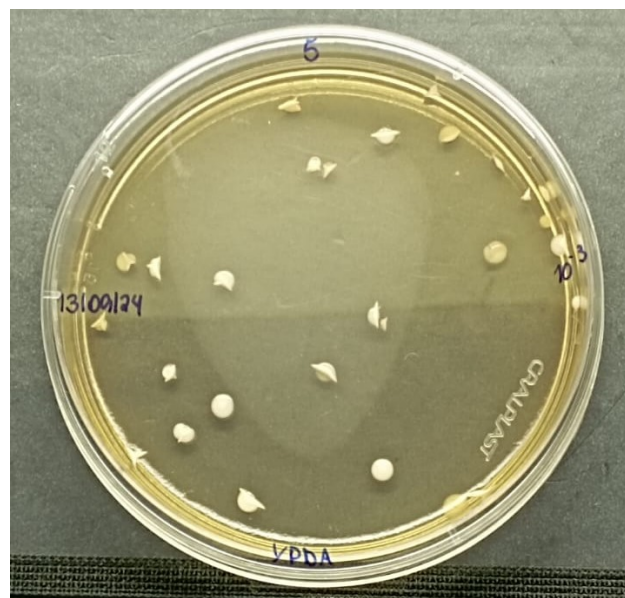
Figura 47 Mosto de Milho com CA-11



Fonte:autoral

Obteve-se um grande crescimento de leveduras nesse plaqueamento.

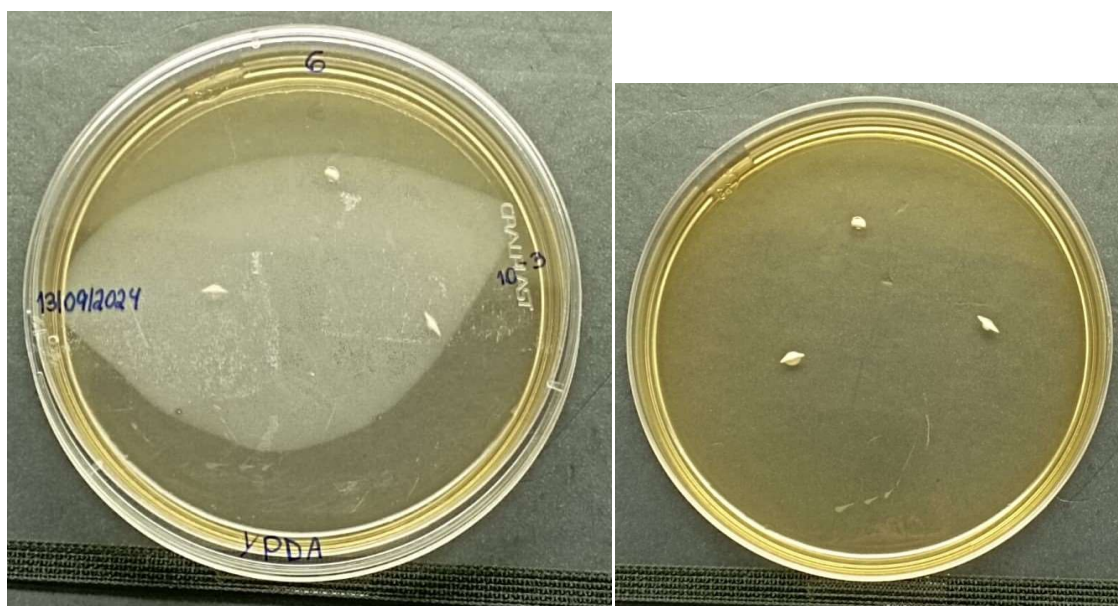
Figura 48 Mosto de Abacaxi com casca



Fonte:autoral

Neste plaqueamento o crescimento de leveduras foi bom comparado com o primeiro e o quarto que foram maiores.

Figura 49 Mosto de Abacaxi sem Casca



Fontes:autorais

Obteve-se um baixo crescimento de leveduras comparando com os outros plaqueamentos, tirando o terceiro que não cresceu nenhuma levedura.

Com o resultado do plaqueamento em mãos, realizamos a contagem das leveduras que cresceram com a ajuda da Vanessa e fizemos uma tabela dos resultados.

Tabela 1 Contagem de Leveduras

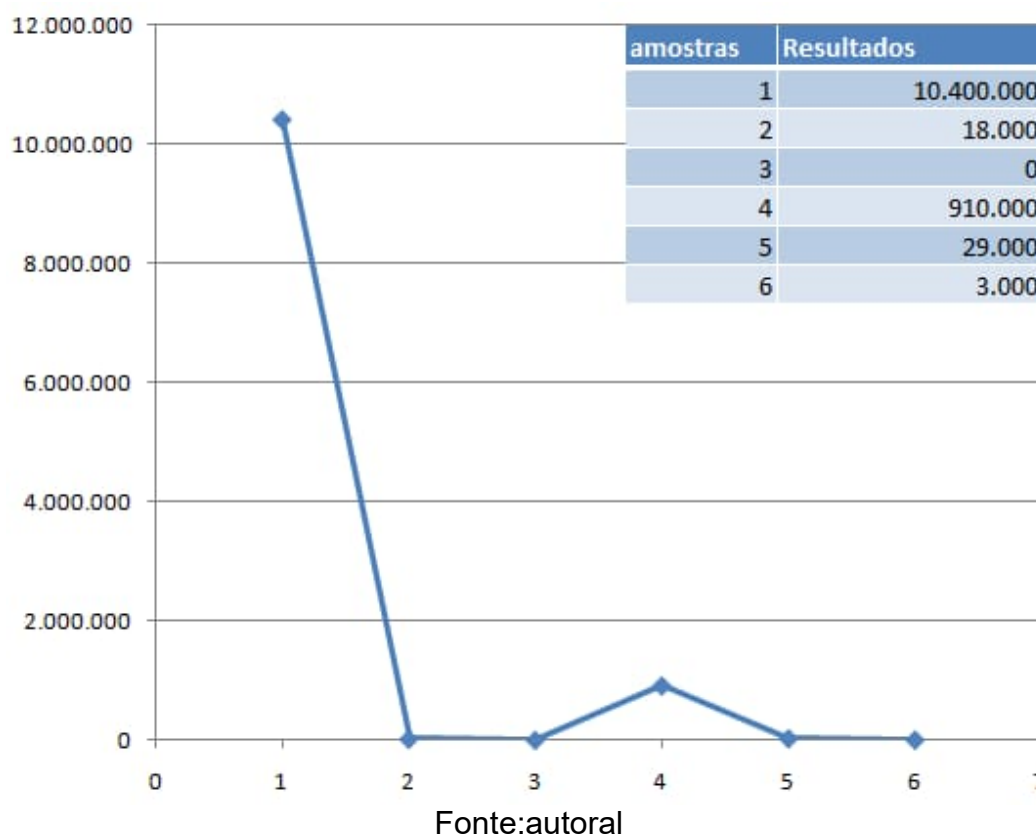
Resultados	
Amostra	Leveduras Totais (UFC/mL)
1	$1,04 \times 10^7$
2	$1,80 \times 10^4$
3	$< 10^3$
4	$9,10 \times 10^5$
5	$2,90 \times 10^4$
6	$3,00 \times 10^3$

Fonte:autoral

Com essa tabela podemos realizar a contagem de leveduras que estão presentes nos nossos mostos, assim podemos avaliar qual mosto é mais viável para a produção de água ardente.

No gráfico a seguir veremos os resultados da contagem fora da notação científica para ficar mais fácil o entendimento.

Gráfico 3 Resultados da contagem de leveduras



No gráfico observa-se os resultados da contagem de leveduras em cada plaqueamento.

Analisando o gráfico vemos que a amostra 1 e a amostra 4 são as que mais tiveram crescimento de leveduras então eles são os mais viáveis para realizar o processo fermentativo de água ardente.

A amostra 1 apresentou o maior crescimento de leveduras, o que nos surpreendeu, uma vez que, devido à baixa temperatura, esperávamos que o processo fermentativo fosse limitado. No entanto, ao contrário de nossas expectativas, essa amostra demonstrou a fermentação mais intensa.

5 CONCLUSÃO

A pesquisa analisou a viabilidade e o desempenho das células de leveduras no mosto com diferentes tipos de fermentos. O objetivo foi otimizar o processo de fermentação em termos de tempo, qualidade e custo. Para isso, foram testados seis tipos de mosto, com variadas fontes de levedura e condições específicas.

Os resultados indicaram que os mostos com maior crescimento celular foram os preparados com fermento refrigerado e milho + CA-11. Esse crescimento está relacionado à escolha adequada do fermento e às condições de temperatura. Isso demonstra que fatores como o ambiente fermentativo influenciam diretamente a viabilidade celular.

Esses dados reforçam a importância de ajustar as condições do mosto para aumentar a qualidade e eficiência da fermentação. Com a redução do tempo de fermentação e a minimização de contaminações, é possível atender às demandas industriais de forma mais eficaz. Além disso, os resultados fornecem subsídios importantes para a produção de bebidas alcoólicas eficientes e de alta qualidade.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J. M. Estudo da viabilidade de leveduras na fermentação alcoólica com contaminação bacteriana. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.
- ALCARDE, A. R.; PONTIERI, M. H.; FONTES, L. R. Avaliação de leveduras selvagens em fermentações alcoólicas industriais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/kDZtsGXbkHrqJ4FJWBH6jXd/>. Acesso em: 29 out. 2024.
- AMORIM, V. H. (Org.). *Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia*. Piracicaba: Regina Machado Leão, 2005.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação: biotecnologia. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. v. 5. 43 p.
- BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J. M.; SALMON, J. M. A levedura de fermentação alcoólica. In: FLANZY, C. *Enología: fundamentos científicos e tecnológicos*. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000. p. 274-315.
- BEZERRA, Brenda Gundim. Bebida fermentada alcoólica à base de abacaxi e gengibre: caracterização físico-química e sensorial do produto elaborado. In: *Anais II Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências (CONAPESC)*, 2017. Editorarealize.
- CARDOSO, M. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em meio de fermentação natural. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- CARVALHO, J. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, E. S. Viabilidade de células de levedura em processos de fermentação alcoólica para produção de bioetanol. *Revista Brasileira de Fermentação e Bioprocessos*, v. 10, n. 1, p. 44-57, 2021.
- CHITARRA, M. I.; CHITARRA, A. B. *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- DUTCHER, J. D.; et al. Advanced Techniques for Monitoring Fermentation Processes. *Journal of Applied Microbiology*, 2004.
- FIGUEIREDO, D. F.; RIBEIRO, P. V. Análise da fermentação de melaço de cana-de-açúcar com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol. *Revista Unisagrado*, v. 5, n. 2, p. 99-110, 2022.
- FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n. 3, p. 326-330, 2003.
- GONÇALVES, A. M. Produção de bebida fermentada a partir de mosto de milho utilizando diferentes linhagens de leveduras. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/d49dae33-2106-4518-8d3a-0e0db96e29b5/content>. Acesso em: 29 out. 2024.
- GONDIM, A. M.; MOURA, V. M. F.; DANTAS, S. A.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

KURTZMAN, C. P.; et al. The yeast: A taxonomic study. Elsevier, 2011.

LIMA, O. R. Avaliação de leveduras viáveis e não viáveis em diferentes fases da fermentação no processo de produção de cerveja. 2024. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José do Rio Preto, 2024.

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

LODDER, J. The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier, 1984.

PARENTE, Gisleânia Dourado Landim. Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de plantas medicinais. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/riufcg/890/GISLEÂNIA%20DOURADO%20LANDIM%20PARENTE%20-%20DISSERTAÇÃO%20PPGSA%20PROFISSIONAL%202014.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 29 out. 2024.

SOUZA, L. K. S. et al. Determinação de metais em amostras de chá preto e chá verde por ICP OES. Química Nova, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1060-1064, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/MzX6HjCG3X8RKpWQGct6gLj/?lang=pt#>. Acesso em: 29 out. 2024.

SOUZA, Ana Carolina de Almeida. Produção de bebidas fermentadas a partir de milho: caracterização, qualidade e potencial de mercado. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-9VCM6W>. Acesso em: 29 out. 2024.

MARCHIOLI, P. V.; MARTINEZ, R.; PLENS, A.* Análise da fermentação e reutilização de leveduras no mosto cervejeiro. 2024. Trabalho apresentado no Congresso Uniso, Universidade de Sorocaba.

OLIVEIRA, A. L.; SANTOS, R. T.; ALCARDE, A. R.* Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 48, n. 3, p. 458-463, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/kDZtsGXbkHrqJ4FJWBH6jXd/>. Acesso em: 29 out. 2024.

PAPAGEORGIOU, A. C. et al.* Impact of nutrient supplementation on yeast fermentation performance. Journal of Applied Microbiology, v. 105, n. 5, p. 1377-1384, 2008.

RIVERA, M. C.; LÓPEZ, J. J.; BARRAGÁN, S. M.; ECHAVARRÍA, D. A.; CARBAJO, A. A.* Análisis de la fermentación alcohólica de mosto de maíz com diferentes cepas de levaduras. Revista de Ciencias Ambientales, v. 8, n. 1, p. 37-46, 2018. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/1953/195320533023.pdf>. Acesso em: 29 out. 2024.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A.* Fermentação alcoólica. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). Produção artesanal de aguardente. Lavras: UFLA, 2001.

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H.; ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P.* Avaliação da fermentação alcoólica em diferentes condições. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 695, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/MzX6HjCG3X8RKpWQGct6gLj/?lang=pt#>. Acesso em: 29 out. 2024.

SILVA, J. C.; LOPES, A. M.; SANTOS, R. A.; COSTA, R. P.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais. *Química Nova*, v. 44, n. 5, p. 715-722, 2021.

SOCIEDADE CIENTÍFICA.* Avaliação do comportamento e viabilidade celular de levedura em diferentes alturas durante a fermentação de cerveja Ale. Scientific Society, 2023.

SOUZA, Ana Carolina de Almeida.* Produção de bebidas fermentadas a partir de milho: caracterização, qualidade e potencial de mercado. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/bitstream/ppgcienci/>>. Acesso em: 29 out. 2024.

SOUZA, L. K. S. et al.* Determinação de metais em amostras de chá preto e chá verde por ICP OES. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1060-1064, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/MzX6HjCG3X8RKpWQGct6gLj/?lang=pt#>>. Acesso em: 29 out. 2024.

THE, P. M. P.* Efeitos da associação de tratamento hidrotérmico, cloreto de cálcio e atmosfera modificada sobre o escurecimento interno e qualidade do abacaxi cv. Smooth Cayenne. 2001. 128 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SILVA, J. C.; LOPES, A. M.; SANTOS, R. A.; COSTA, R. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais. *Química Nova*, v. 44, n. 5, p. 715-722, 2021.

SOCIEDADE CIENTÍFICA. Avaliação do comportamento e viabilidade celular de levedura em diferentes alturas durante a fermentação de cerveja Ale. Scientific Society, 2023.

SOUZA, Ana Carolina de Almeida. Produção de bebidas fermentadas a partir de milho: caracterização, qualidade e potencial de mercado. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-9VCM6W>>. Acesso em: 29 out. 2024.

SOUZA, L. K. S. et al. Determinação de metais em amostras de chá preto e chá verde por ICP OES. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1060-1064, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/MzX6HjCG3X8RKpWQGct6gLj/?lang=pt>>. Acesso em: 29 out. 2024.

THE, P. M. P. Efeitos da associação de tratamento hidrotérmico, cloreto de cálcio e atmosfera modificada sobre o escurecimento interno e qualidade do abacaxi cv. Smooth Cayenne. 2001. 128 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001. Disponível em: RI UFLA: Efeito da associação de tratamento hidrotérmico, cloreto de cálcio e atmosfera modificada sobre o escurecimento interno e qualidade do abacaxi cv. Acesso em: 29 out. 2024.