



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GEIZA SUZART ARAÚJO

**ELABORAÇÃO DE UMA CERVEJA ALE UTILIZANDO MELÃO DE
CAROÁ [*Sicana odorífera (Vell.) Naudim*] COMO ADJUNTO DO MALTE**

Salvador

2016

GEIZA SUZART ARAÚJO

ELABORAÇÃO DE UMA CERVEJA ALE UTILIZANDO MELÃO DE CAROÁ [*Sicana odorífera* (Vell.) Naudim] COMO ADJUNTO DO MALTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Luporini

Co-orientador: Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho

Salvador
2016



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



EUFBA

A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação “ELABORAÇÃO DE UMA CERVEJA ALE UTILIZANDO MELÃO CAROÁ (SICANA ODORÍFERA (VELL) NAUDIN) COMO ADJUNTO DE MALTE”, de **Geiza Suzart Araújo** como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Salvador Ba, 30 de maio de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Samuel Luporini
(Orientador-UFBA)

Prof. Dr. Giovanni Brandão Mafra de Carvalho
(Co-orientador - UEFS)

Profa. Dra. Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato
(UFBA)

Prof. Dr. Ernesto Acosta Martinez
(UEFS)

Dedico esta conquista, especialmente, a Deus que tem me fortalecido constantemente; aos meus pais (Edna e Antonio), que de uma forma tão prazerosa, auxiliam-me sempre; aos meus irmãos (Erivaldo, Emerson, Everson e Ediane) pelo carinho e companheirismo, ao meu noivo (Gonçalo Henrique), pela amizade e apoio.

AGRADECIMENTOS

Palavras, tais como otimismo e determinação talvez sintetizem claramente o sonho até aqui conquistado: a concretização de uma etapa de uma longa jornada que se procede. É indubitável, no entanto, que tudo tem sido possível devido à existência de uma equipe espetacular, digna de aplausos, que merece ser aqui mencionada, uma vez que as palavras supracitadas poderiam se fazer ausentes se não existissem esses seres me fortalecendo.

Agradeço pela conclusão dessa etapa do trabalho ao todo poderoso Deus. Qualquer palavra mencionada aqui não expressaria veemente o quanto sinto a presença Dele em cada passo dado. Eu vos agradeço pela minha vida e por guiar meus passos constantemente.

Aos meus pais (Edna e Antonio) – meus grandes presentes divinos. Agradeço-lhes por me tornarem uma pessoa digna, pela fortaleza constante, pelo processo eficiente de educação, pelas palavras incentivadoras e por sonharem comigo sempre. São meus exemplos!

Aos meus irmãos (Emerson, Everson, Erivaldo e Ediane), sou muito grata a vocês pelo incentivo e o carinho. Vocês são, indiscutivelmente, colaboradores da realização desse sonho.

Ao meu amado Gonçalo Henrique, agradeço por estar me apoiando sempre, pelos carinhos, pela paciência. Enfim, obrigada por ser meu grande amor e amigo.

Aos meus sobrinhos, Louíse Beatriz e Eduardo Levi, que vieram para trazer mais alegria para minha vida, contribuindo de forma incentivadora para minha conquista.

Ao meu orientador Samuel Luporini, agradeço imensamente pelo incentivo, atenção e ensinamentos dados durante toda pesquisa. Sinto-me muito feliz por ter tido a oportunidade de ser aluna e sua orientanda.

Ao meu co-orientador Giovani Brandão Mafra de Carvalho, serei eternamente grata por te me acolhido tão bem durante todo este tempo. Afinal, foi através de suas orientações que comecei a dar passos mais expressivos em relação às pesquisas científicas.

Aos meus colegas Rafaela, Jéssica, Verena, Cassiane, Caroline, Jarlon, Karina, Isabela, Damari, Mariana e Reynania, que me ajudaram durante esta caminhada.

Aos professores da UEFS, em especial, Ernesto Martinez, Sílvia Maria e Taís, agradeço-lhes por sempre se mostraram dispostos a ajudar.

Ao professor Gervásio da UNEB de Senhor do Bonfim e a aluna Rafaela Teixeira pela permissão e apoio para realização de algumas análises no campus.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Diante de um mercado cada vez mais exigente e competitivo, as indústrias cervejeiras anseiam por inovações e redução de custos. Neste contexto, a utilização de adjuntos para a produção de cerveja torna-se uma tendência de grande importância. Os mesmos são fontes de carboidratos que substituem uma parte do malte de cevada na constituição do mosto cervejeiro. Atualmente, alguns adjuntos não convencionais, como mel, banana e fécula de mandioca têm sido utilizados, ampliando conseqüentemente, a diversidade de matérias-primas que podem ser aplicadas na produção de cerveja. O melão de caroá (*Sicana odorífera*) é uma fruta subutilizada de menor expressão econômica, mas que possui aroma e sabor agradáveis, assim como concentração de carboidratos e minerais, que tornam viável utilizá-lo na aplicação biotecnológica como adjunto do malte, sendo este o principal objetivo deste trabalho. Inicialmente, foram realizadas as análises físico-químicas da polpa de melão de caroá e dos mostos com as seguintes concentrações desse adjunto: 0, 10, 30 e 50%. Em relação à polpa, foram analisados os seguintes parâmetros: umidade, sólidos solúveis, carboidratos totais, açúcares redutores, pH, proteínas, lipídeos, acidez total titulável e minerais (Cd, Ca, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, P, Li, Mg, Mn, Mo, K, Se, Na, V, Zn). Para os mostos, foram determinados estes mesmos parâmetros, com exceção da umidade e dos lipídeos, sendo incluídos a cor e o amargor. Realizou-se um tratamento estatístico dos dados, utilizando o programa SISVAR 5.0, podendo-se verificar que houve diferença significativa ao nível de 5% entre os parâmetros avaliados dos quatro mostos, com exceção do teor de sólidos solúveis. Em seguida, iniciaram-se os testes fermentativos em escala laboratorial (250 mL) com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* do tipo *ale*, utilizando nos ensaios o adjunto nas quatro diferentes proporções supracitadas, e realizou-se um acompanhamento analítico do processo a fim de identificar a melhor concentração de adjunto para aplicação em larga escala, avaliando-se os seguintes parâmetros: concentração celular, viabilidade celular, teor de etanol, extrato aparente, concentrações de ácidos orgânicos e glicerol. A partir da análise estatística, verificou-se que o mosto com 50% de polpa apresentou resultados mais satisfatórios. A produtividade volumétrica em etanol (Q_p) correspondeu a 0,47g/L.h, fermentabilidade aparente igual a 89,42% e teor de etanol de 5,7%. O processo fermentativo deste mosto foi ampliado na escala piloto (100L) do Laboratório de Fermentação da Universidade Estadual de Feira de Santana, realizando também o acompanhamento analítico do processo fermentativo a partir da determinação de concentração celular, viabilidade celular, teor de etanol, extrato aparente, concentrações de ácidos orgânicos e glicerol, resultando em Q_p igual a 0,45 g/L.h, 88,9% de fermentabilidade aparente e teor de etanol correspondente a 5,5%. A cerveja obtida foi analisada físico-quimicamente quanto ao pH, proteína, cor, amargor, glicerol e ácidos orgânicos. Posteriormente, realizou-se a análise sensorial, avaliando a aceitação e a intenção de compra de 70 provadores, dos quais 77,14% aceitaram o produto e 72,86% demonstraram intenção de compra. Podendo-se inferir que a aplicação biotecnológica do melão de caroá pode ser considerada uma alternativa para a indústria cervejeira.

PALAVRAS – CHAVE: Melão de caroá (*Sicana odorífera*); Adjunto; Fermentação; Cerveja.

ABSTRACT

Due to a marked each time more demanding and competitive, the breweries industries aim to innovation and cost reduction. In this context, the use of adjunct for brewing becomes a tendency very important. They are sources of carbohydrates that replace a portion of barley malt in the constitution of beer wort. Currently, some unconventional adjuncts such as honey, banana and cassava starch have been used, increasing the diversity of raw materials that can be applied in beer production. The “melão de caroá” (*Sicana odorífera*) is an underutilized fruit of low economic importance, but it has pleasant aroma and taste, as well as concentration of carbohydrates and minerals, that become feasible to use it in biotechnological application as malt adjunct, constituting the main objective of this work. Initially, physico-chemical analysis of the “melão de caroá” pulp and of the worts with the following concentrations of this adjunct: 0, 10, 30 and 50% were carried out. In relation to the pulp, the following parameters were analyzed: moisture, soluble solids, total carbohydrates, reducing sugar, pH, proteins, lipids, titratable total acidity and minerals (Cd, Ca, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, P, Li, Mg, Mn, Mo, K, S, Na, V, Zn). For the worts, the same parameters were determined; exception for moisture and lipids, but the color and bitterness were included. A statistical analysis of the data was conducted, using the SISVAR 5.0 program and it can be verified that there was a significant difference at level of 5% among the assessed parameters of the four worts, with exception for the content of soluble solids. Then, the fermentative tests with commercial *ale Saccharomyces cerevisiae* yeast in laboratorial scale (500 mL) were started, using in the tests the adjunct in the four different proportions described above, and an analytical monitoring of the process to identify the best adjunct concentration for application in large scale was performed, assessing the following parameters: cell concentration, cell viability, ethanol content, apparent extract, concentrations of organic acids and glycerol. From the statistical analysis it was found that the wort with 50% of pulp presented more satisfactory results. The volumetric productivity (Q_p) corresponded to 0.47 g/L.h, apparent fermentability equal to 89.42% and ethanol content of 5.7%. The fermentation process of this wort with 50% of adjunct was expanded in pilot scale (100L) from Fermentation Laboratory of the State University of Feira de Santana, also performing the analytical monitoring of the fermentation process by determining of cell concentration, cell viability, ethanol content, apparent extract, organic acids and glycerol concentration, resulting in Q_p equal to 0.45 g/L.h, apparent fermentability of 88.9% and ethanol content of 5.5%. The obtained beer was analyzed physico-chemically in relation to pH, protein, color, bitterness, glycerol and organic acids. Later, there was the sensory analysis, assessing the acceptance and purchase intent of 70 tasters, of who 77.14% have accepted the product and 72.86% demonstrated purchase intent. Being possible to infer that the biotechnological application of “melão de caroá” can be considered an alternative to the brewing industry.

KEYWORDS: *Sicana odorífera*; Adjunct; Fermentation; Beer.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição da água dos principais centros cervejeiros (ppm) (HOUGH, 1985).	25
Tabela 3.2 - Composição aproximada do malte (HUTKINS, 2006).....	26
Tabela 3.3 - Composição do lúpulo em flor (CRUZ, 2007).....	30
Tabela 3.4 - Perfil de açúcares no mosto 11 -12 °P (STEWART, 2009).....	49
Tabela 4.1 – Porcentagem de mosto puro malte e adjunto (polpa de melão de caroá).	60
Tabela 4.2 - Comprimentos de onda, limites de detecção e quantificação e parâmetros da curva analítica para os elementos estudados.	62
Tabela 5.1- Características físico-químicas da polpa de melão de caroá (<i>Sicana odorífera</i>) e dados da literatura.	82
Tabela 5.2 - Concentração de minerais na polpa do melão de caroá (<i>Sicana odorífera</i>) e dados da literatura.	85
Tabela 5.3 - Características físico-químicas dos mostos com adjunto (polpa de melão de caroá).	88
Tabela 5.4 - Concentração de minerais no mosto.	90
Tabela 5.5 - Perfil da concentração de ácidos orgânicos (g/L) no tempo final da fermentação primária dos mostos com as seguintes concentrações de adjuntos (polpa de melão de caroá): 0, 10, 30 e 50%. ..	99
Tabela 5.6 – Parâmetros fermentativos do final da fermentação dos mostos com diferentes concentrações de adjunto.	100
Tabela 5.7 - Tratamento estatístico dos parâmetros fermentativos do final da fermentação de mostos com diferentes concentrações de adjunto (polpa de melão de caroá).	102
Tabela 5.8 - Concentração de açúcares fermentáveis no mosto puro malte e no mosto com 50% de adjunto (polpa de melão de caroá).	104
Tabela 5.8 - Características físico-químicas da cerveja com 50% de adjunto (polpa de melão de caroá).	110
Tabela 5.9 - Concentração de ácidos orgânicos na cerveja com 50% de adjunto (polpa de melão de caroá).....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura química de ácidos e conversão de ácidos por isomerização (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012)	29
Figura 3.2 - Melão de caroá (<i>Sicana odorifera</i> (Vell.) Naudim) (MORTON, 1987).....	35
Figura 3.3 - Preparação dos principais tipos de cerveja (Adaptado de RUSSEL, 1994)	41
Figura 3.4 - Tempo e temperatura utilizados na mosturação pelo processo de infusão (Adaptado de CARVALHO ; ZAMBIAZI , 2011).....	44
Figura 3.5 - Formação e degradação do diacetil na cerveja em maturação (LINKO <i>et al.</i> , 1998).....	51
Figura 3.6 - Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação X, P e S são as concentrações de microrganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente (HISS, 2001)	55
Figura 4.1 - Sanitização dos melões	59
Figura 4.2 - Melões fragmentados.....	59
Figura 4.3 - Despulpamento dos melões	59
Figura 4.4 - Tratamento da polpa	65
Figura 4.5 - Mostos com as diferentes concentrações de adjunto (0, 10, 30 e 50%) respectivamente da direita para a esquerda.....	65
Figura 4.6 - Solução utilizada na padronização	66
Figura 4.7 - Solução utilizada na propagação	66
Figura 4.8 - Mostos com as diferentes concentrações de adjuntos (0, 10, 30 e 50%) respectivamente da direita para esquerda, inoculados com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
Figura 4.9 - Planta Piloto do Laboratório de Fermentação da UEFS- BA.....	71
Figura 4.10 - Grãos de malte inteiros.....	72
Figura 4.11 - Grãos de malte moídos	72
Figura 4.12 - Mistura submetida à mosturação	73
Figura 4.13 - Reação do iodo na ausência do amido.....	73
Figura 4.14 - Transferência do mosto	74
Figura 4.15 - Fervura do mosto.....	75
Figura 4.16 - Mosto depois do resfriamento	75
Figura 4.17 - Tanque de fermentação.....	77

Figura 4.18 - Modelo de ficha de avaliação usado na análise sensorial.....	81
Figura 5.1 - Perfis de concentração de células em suspensão (cel/mL) (\diamond) e de viabilidade celular (%) (\square) nos seguintes mostos: (A) com 0% de adjunto (polpa de melão de caroá); (B) com 10% de adjunto (polpa de melão de caroá); (C) com 30 % de adjunto (polpa de melão de caroá) e (D) com 50 % de adjunto (polpa de melão de caroá)	94
Figura 5.2 - Perfis da concentração de etanol (g/L) (Δ) e de concentração de extrato aparente (g/L) (\square) nos seguintes mostos: (A) com 0% de adjunto (polpa de melão de caroá); (B) com 10% de adjunto (polpa de melão de caroá); (C) com 30 % de adjunto (polpa de melão de caroá) e (D) com 50 % de adjunto (polpa de melão de caroá)	96
Figura 5.3 - Perfil da concentração de glicerol durante a fermentação primária dos mostos com as seguintes concentrações de adjunto (polpa de melão de caroá): 0, 10, 30 e 50%	98
Figura 5.4 - Perfis de viabilidade celular (\square) e de concentração celular das células viáveis (\diamond) durante a fermentação do mosto 50% de adjunto	103
Figura 5.5 - Comparação dos perfis do consumo de açúcares no processo fermentativo do mosto com 50% de adjunto (A) e adaptado de Stewart (2009) (B)	105
Figura 5.6 - Perfis da concentração de extrato real (g/L) (Δ) e da produção de etanol (g/L) (\square) no processo do mosto com 50% de adjunto (polpa de melão de caroá).....	106
Figura 5.7 - Perfil da concentração de ácidos orgânicos (g/L) durante a fermentação do mosto com 50% de adjunto (polpa de melão de caroá)	108
Figura 5.8 - Perfil da concentração de glicerol (g/L) durante a fermentação com 50% de adjunto (polpa de melão de caroá)	109
Figura 5.10 - Cerveja com melão de caroá do tipo <i>ale</i> com teor alcoólico de 5,5%	113
Figura 5.11 - Resultado do teste de aceitação da cerveja com polpa de melão de caroá	114
Figura 5.12 - Resultado da intenção de compra dos provadores em relação à cerveja	114

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Qp - Produtividade volumétrica em etanol (g/L.h)

Yp/s - Fator de conversão de substrato em produto (g/g)

X - Concentração de biomassa (g/L)

P - Concentração de produtos (g/L)

S - Concentração de substrato (g/L)

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

Cel/mL - Células por mililitro

P - Desvio padrão

EBC - *European Brewery Convention*

IBU - *Internacional Bitterness Units* (Unidade Internacional de Amargor)

°P - Graus plato

Eq - Equação

Ca - Cálcio

Cd - Cádmio

Co - Cobalto

Cu - Cobre

Cr - Cromo

Fe - Ferro

K - Potássio

Li - Lítio

Mg - Magnésio

Mo - Molibdênio

Mn - Manganês

Na - Sódio

P - Fósforo

Pb - Chumbo

Se - Selênio

V - Vanádio

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Histórico e evolução da cerveja	19
3.2. Definição e características da cerveja.....	21
3.2.1. Quanto ao extrato primitivo:.....	22
3.2.2. Quanto à cor:	22
3.2.3. Quanto ao teor alcoólico:	22
3.2.4. Quanto à proporção de malte de cevada:	22
3.2.5. Quanto à fermentação:.....	23
3.3. Matérias - primas da cerveja	23
3.3.1. Água	24
3.3.2. Cevada e malte	26
3.3.3. Lúpulo.....	27
3.3.4. Adjuntos	30
3.3.4.1. Melão Caroá: Uma alternativa como adjunto no processo cervejeiro	33
3.4. Microbiologia do processo cervejeiro	36
3.4.1. Leveduras	36
3.4.2. Microrganismos contaminantes	38
3.4.2.1. Leveduras selvagens.....	39
3.4.2.2. Bactérias	39
3.5. Processo cervejeiro tradicional	40
3.5.1. Produção do mosto	41
3.5.1.1. Malteação	41
3.5.1.2. Moagem do malte.....	42
3.5.1.3. Mosturação	43
3.5.1.4. Clarificação (filtração do mosto).....	45
3.5.1.5. Fervura	46
3.5.2. Tratamento do mosto	47
3.5.3. Fermentação.....	48
3.5.4. Maturação	49

3.5.5. Clarificação (filtração da cerveja).....	52
3.6. Bioquímica da fermentação	52
3.7. Cinética da fermentação alcoólica	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1. Locais de desenvolvimento das análises	57
4.2. Materiais.....	57
4.2.1. Água	57
4.2.2. Malte de cevada	57
4.2.3. Lúpulo.....	57
4.2.4. Melão de caroá (<i>Sicana odorífera</i>).....	58
4.2.5. Microrganismo.....	58
4.3. Obtenção da polpa de melão de caroá (adjunto) e do mosto puro malte	58
4.4. Obtenção dos mostos com adjunto (polpa de melão de caroá).....	59
4.5. Caracterização físico-química da polpa de melão de caroá (<i>Sicana odorífera</i>) e dos mostos com adjunto	60
4.5.1. Determinação do pH.....	60
4.5.2. Determinação dos sólidos solúveis totais	60
4.5.3. Determinação de acidez total titulável.....	60
4.5.4. Determinação de carboidratos totais	61
4.5.5. Determinação de açúcares redutores	61
4.5.6. Determinação de proteínas	61
4.5.7. Determinação de lipídeos	61
4.5.8. Determinação de umidade	61
4.5.9. Determinação de minerais	61
4.5.10. Determinação de cor.....	63
4.5.11. Determinação de amargor	63
4.6. Análise estatística dos dados da caracterização físico-química da polpa e dos mostos com adjunto.....	63
4.7. Processo fermentativo dos mostos com adjunto em escala laboratorial	63
4.7.1. Tratamento da polpa de melão de caroá	64
4.7.2. Obtenção dos mostos com adjunto.....	65
4.7.3. Padronização e propagação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
4.7.4. Fermentação primária do mosto com o adjunto.....	67
4.8. Acompanhamento analítico da fermentação primária em escala laboratorial.....	68
4.8.1. Concentração celular e viabilidade celular	68

4.8.2. Teor de etanol e extrato aparente	68
4.8.3. Concentração de ácidos orgânicos e glicerol.....	69
4.9. Cálculo dos parâmetros fermentativos em escala laboratorial	69
4.10. Análise estatística dos dados fermentativos	70
4.11. Produção da cerveja em escala piloto	70
4.11.1. Produção do mosto	71
4.11.1.1. Malteação	71
4.11.1.2. Moagem.....	71
4.11.1.3. Mosturação	72
4.11.1.4. Filtração.....	73
4.11.1.5. Fervura do mosto.....	74
4.11.1.6. Resfriamento	75
4.11.2. Preparo do mosto com adjunto	76
4.11.3. Fermentação primária	76
4.11.3.1. Padronização e propagação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
4.11.3.2. Processo fermentativo	76
4.11.4. Maturação (fermentação secundária).....	77
4.12. Acompanhamento analítico da fermentação primária	77
4.12.1. Concentração celular e viabilidade celular	78
4.12.2. Concentração de etanol, glicerol e ácidos orgânicos	78
4.12.3. Concentração de açúcares fermentáveis.....	78
4.12.4. Concentração de extrato aparente	78
4.13. Parâmetros fermentativos.....	79
4.14. Caracterização físico-química da cerveja com 50% de adjunto	79
4.14.1. Determinação de pH.....	79
4.14.2. Determinação de proteínas	79
4.14.3. Determinação de cor.....	79
4.14.4. Determinação de amargor	79
4.14.5. Determinação de ácidos orgânicos	79
4.15. Análise Sensorial.....	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1. Caracterização físico-química da polpa do melão de caroá e dos mostos com adjunto	82
5.1.1. Caracterização da polpa de melão de caroá (<i>Sicana odorífera</i>)	82
5.1.2. Caracterização dos mostos com diferentes concentrações de adjunto	87

5.2. Acompanhamento analítico da fermentação em escala laboratorial	92
5.2.1. Concentração celular (células em suspensão) e viabilidade celular	93
5.2.2. Consumo de substrato e produção de etanol	95
5.2.3. Concentração de glicerol e ácidos orgânicos durante a fermentação	97
5.3. Parâmetros fermentativos em escala laboratorial	100
5.4. Tratamento estatístico dos parâmetros fermentativos em escala laboratorial	101
5.5. Produção da cerveja com 50% de adjunto em escala piloto	102
5.5.1. Acompanhamento analítico da fermentação em escala piloto	102
5.5.1.1. Concentração celular (células em suspensão) e viabilidade celular.....	102
5.5.1.2. Perfil do consumo de açúcares durante a fermentação primária.....	103
5.5.1.3. Consumo de substrato e produção de etanol	106
5.5.1.4. Concentração de ácidos orgânicos durante a fermentação primária do mosto com 50% de adjunto.....	107
5.5.1.5. Concentração de glicerol durante o processo fermentativo do mosto com 50% de adjunto.....	108
5.6. Parâmetros fermentativos em escala piloto	109
5.7. Caracterização físico-química da cerveja com 50% de adjunto	110
5.8. Análise Sensorial	113
6. CONCLUSÃO	116
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	117
REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção da cerveja ocorreu há milhares de anos antes de Cristo, tornando-a uma das bebidas mais conhecidas e antigas do mundo. Naquele período, a bebida era considerada mistério e arte, talvez pelo desconhecimento das razões científicas, que justificam todo processo de elaboração da mesma. No entanto, este fato não impossibilitou a introdução de novas técnicas, a fim de obter um produto com melhores atributos, iniciando-se, assim, o processo de evolução da bebida conhecida atualmente.

O setor cervejeiro tem evoluído e contribuído significativamente para o desenvolvimento econômico do Brasil, que é avaliado, segundo SEBRAE (2014) como terceiro maior produtor de cerveja do mundo, superado apenas pela China e pelos Estados Unidos. Em relação ao consumo per capita, o Brasil ainda ocupa a 24^a posição mundial, com consumo de 68 litros por pessoa, porém o mercado brasileiro possui um grande potencial de crescimento. Os países que se destacam quanto a este critério são a República Tcheca (149 litros per capita), Áustria (108 litros) e Alemanha (106 litros).

Em 2013, existiam no Brasil cerca de 200 microcervejarias, as quais representavam apenas 0,15% do mercado total de cervejas, com objetivo de alcançar 2% do mercado total nos próximos 10 anos (SEBRAE, 2014). A perspectiva deve-se a inúmeras inovações, que têm sido adotadas para a elaboração da cerveja, buscando diversificar a linha de produtos, otimizar o processo, assim como reduzir o custo final da bebida. A substituição parcial do malte por adjuntos, que é legalmente permitida no Brasil através do Decreto n^o. 6.871 de 4 de junho de 2009, é uma das práticas que têm contribuído para o processo evolutivo do mercado cervejeiro.

A produção da cevada no Brasil não consegue suprir à demanda, então, a utilização de matérias-primas nacionais como adjuntos possibilita além da redução do custo, o preparo de cerveja com características sensoriais diferentes daquelas usualmente encontradas. A elaboração da cerveja, utilizando adjuntos não convencionais, tais como: banana, fécula de mandioca, mel, entre outros, tem sido uma nova tendência para suprir às exigências do mercado. Uma matéria prima, que pode ser utilizada como fonte secundária de carboidrato para o processo de fermentação da cerveja, podendo aromatizá-la ou não, é o melão de caroá (*Sicana odorífera* (Vell). Naudin).

O melão de caroá (*Sicana odorífera*) é um fruto pertencente à família das cucurbitáceas. Acredita-se que é nativa do Brasil, mais especificamente, da região do Recôncavo Baiano, mas tem se espalhado por toda América Tropical. Este fruto tem sido muito utilizado no Brasil para a ornamentação e para a medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, sendo um fruto subutilizado de menor expressão econômica, mas que possui características apreciáveis.

Esse trabalho busca elaborar e caracterizar uma cerveja de alta fermentação (*ale*), utilizando como adjunto o melão de caroá, a fim de desenvolver um processo cervejeiro economicamente viável, contribuir na diversificação da linha de produtos, agregar valor à matéria-prima, que ainda não foi fonte de estudo em trabalhos científicos no que tange a sua aplicabilidade na área biotecnológica, e simultaneamente, dar continuidade a linha de pesquisa (Elaboração de Bebidas Fermentadas) coordenada pelo Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho do Laboratório de Fermentação do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Viabilizar o aproveitamento do melão de caroá (*Sicana odorífera*) através de sua aplicação como adjunto do malte, assim como, contribuir para o desenvolvimento de uma cerveja não convencional.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a matéria-prima a ser utilizada como adjunto do malte (melão de caroá), assim como os mostos com as seguintes concentrações de adjuntos: 0, 10, 30 e 50%;
- Realizar ensaios fermentativos em escala laboratorial com capacidade de 500 mL a fim de avaliar a melhor concentração de adjunto através dos seguintes parâmetros: produtividade volumétrica (Q_p), fator real de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$) e fermentabilidade aparente (%);
- Realizar acompanhamento analítico durante o processo fermentativo em escala laboratorial;
- Reproduzir o ponto otimizado em planta piloto de com capacidade de 100L;
- Realizar acompanhamento analítico durante o processo fermentativo em escala piloto;
- Avaliar físico-química e sensorialmente o produto obtido.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico e evolução da cerveja

Existem muitas controvérsias quanto ao período relacionado à origem das primeiras cervejas, porém autores como Mega, Neves e Andrade (2011) relatam que o período que o homem começou a utilizar bebida fermentada foi aproximadamente há 30 mil anos. No entanto, estudos indicam que a produção da cerveja teve seu início por volta de 8000 a.C. Esta bebida foi elaborada simultaneamente com o processo de fermentação de cereais, tais como: milho, centeio e cevada, sendo produzida entre os povos da Suméria, Babilônia, Egito, Grécia e Roma.

Na Mesopotâmia, obteve-se a primeira cerveja, que foi elaborada pelos sumérios da seguinte forma: os grãos de cevada eram moídos, resultando em uma massa consistente denominada de pão. A massa quando era exposta à ação do tempo, umedecia e fermentava pela ação das leveduras selvagens, resultando em “pão líquido”, que nada mais era que uma bebida alcoólica com algumas semelhanças da cerveja dos dias atuais (TSCHOPE, 2001).

No Brasil, a cerveja foi trazida pela família real portuguesa que estava de mudança para o Brasil colônia em 1808, porém apenas em 1836, no *Jornal do Commercio*, Rio de Janeiro, tem-se a primeira notícia publicada sobre a fabricação de cerveja no Brasil (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008). De acordo com Venturini Filho e Cereda (2001), no Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido por D. João durante a permanência real portuguesa no país.

Antigamente, a cerveja possuía uma qualidade inferior devido ao pouco ou total desconhecimento a cerca da função de algumas matérias-primas e do agente modificador das transformações bioquímicas (fermento). A bebida possuía sabor bastante diferente do que conhecemos hoje, pois o comportamento do fermento no processo era pouco conhecido. Usualmente, eram adicionados fermentos selvagens, que produziam cervejas intragáveis. A utilização do lúpulo como agente estabilizante e conservante era desconhecido (TORNIC, 1986).

Desde o surgimento da cerveja, os antigos já se preocupavam em melhorar a qualidade da bebida, mais especificamente, o aroma e o sabor através do uso de aditivos, tais como: o

mel, a canela, anis, gengibre, rúcula, alecrim, cravo e raízes em geral. Tornou-se também usual, após o século VII, a utilização de uma mistura de ervas na produção da bebida chamada de *gruit*, que continha alecrim, artemísia, aquílea, urze e gengibre (BELTRAMELLI, 2012).

Dentre vários povos bárbaros que ocuparam a Europa durante o Império Romano, os de origem germânica foram os que tiveram maior destaque na arte de fabricar cerveja. Eles foram os primeiros a utilizar o lúpulo no processo de elaboração da bebida, conferindo-lhe características mais similares às da cerveja atual (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

Briggs *et al.* (2004) relataram que a Lei da Pureza da Cerveja (*Reinheitsgebot*) foi introduzida em 1516 e aplicada em toda Alemanha desde 1906. Esta lei estabelece que a cerveja só pode ser fabricada com os seguintes ingredientes: água, malte de cevada e lúpulo. Essa limitação tem influenciado o desenvolvimento da tecnologia na produção da cerveja na Alemanha nos últimos cem anos, e sido muito aplicada em vários países nos estágios iniciais de desenvolvimento da fabricação de cerveja, porém, por volta de 1870, cervejeiros americanos já tinham experimentado milho e arroz como adjuntos com o intuito de obter vantagens econômicas e não voltaram mais a produzir cerveja apenas com o malte de cevada. No Reino Unido, houve uma oferta abundante de açúcar das Índias Ocidentais, que também foi utilizado a fim de reduzir custos. Segundo Ferreira *et al.* (2011), a Lei da Pureza da Cerveja tem perdido força em alguns países devido à pressão do mercado para a utilização de novos ingredientes.

Ainda segundo Ferreira *et al.* (2011) ressaltam que a cultura cervejeira apresentou um processo evolutivo bastante notório nos séculos XX e XXI devido ao desenvolvimento tecnológico, ao renascimento da produção caseira de cerveja (*homebrewing*) e à nova geração de microcervejarias pelo mundo, que trazem inovações aos consumidores através da oferta de produtos de qualidade e diversificados. Os autores ainda destacam como algumas inovações, a introdução do lúpulo e a utilização do coque para secagem do malte. Este processo possibilitou que os grãos não fossem torrados, permitindo a produção de uma cerveja clara. Segundo Linko *et al.* (1998), a evolução pode ser notada também em toda cadeia produtiva, ou seja, da produção da cevada à cerveja. No entanto, algumas das novas possibilidades não têm sido aplicadas nos produtos comercializados com o intuito de manter a imagem tradicional, assim como, a incerteza da reação dos consumidores frente a mudanças.

Segundo Carvalho (2009), pode-se notar uma evolução significativa dos conhecimentos científicos devido ao aumento do consumo da cerveja no mundo e duas

tendências que têm se destacado no Brasil, são as cervejas obtidas a partir de mostos concentrados (*High Gravity Brewing*) e a utilização de adjuntos especiais.

De acordo com Muller (2014), no Brasil, atualmente, estão registradas 232 cervejarias e 1110 diferentes tipos de cerveja conforme os dados do Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimento (SIPE) do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Diante do aumento da diversidade das cervejas, dos avanços tecnológicos no setor cervejeiro, assim como na busca de promover a igualdade de condições e competitividade dos produtos nacionais frente aos importados, o MAPA deu início ao processo, que teve como fim revisar os parâmetros de qualidade para a produção de cervejas, os quais estão atualmente vigentes do MERCOSUL. Neste processo, as possíveis alterações foram discutidas, existindo a previsão para que em 2015 a legislação sobre a definição de cerveja, assim como suas características fossem modificadas levando em consideração os seguintes pontos:

1. Utilização de cevada maltada, ou do trigo maltado ou de cereais maltados;
2. Mudança no limite de utilização da cevada e a manutenção da mesma como ingrediente obrigatório;
3. Utilização de outros ingredientes além do lúpulo para conferir o amargor;
4. Uso de produtos de origem animal, como: mel e leite;
5. Uso de frutas, ervas, vegetais, flores (aptas ao consumo humano) e não só do suco ou de extrato de origem vegetal;
6. Envelhecimento da cerveja, pois possibilitaria a produção de cervejas envelhecidas.

3.2. Definição e características da cerveja

O Decreto nº 6.871 (BRASIL, 2009), de 4 de junho de 2009, artigo 36, define a cerveja como uma bebida resultante da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, originado a partir do malte de cevada e água potável, por ação da levedura e com adição de lúpulo. Podendo o malte de cevada e o lúpulo serem substituídos pelos seus respectivos extratos. Quanto ao malte de cevada, parte do mesmo pode ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não deve ser superior a quarenta e cinco por cento em relação ao extrato primitivo. No entanto, se os adjuntos se tratarem de açúcares vegetais diferentes dos

provenientes de cereais, a quantidade máxima a ser empregada em relação ao seu extrato primitivo deve ser menor ou igual a dez por cento em peso na cerveja clara, menor ou igual a cinquenta por cento em peso, podendo conferir ao produto acabado as características de adoçante, na cerveja escura e menor ou igual a dez por cento do extrato primitivo na cerveja extra.

De acordo com o Decreto nº 6.871 (BRASIL, 2009), de 4 de junho de 2009, artigo 38, as cervejas podem ser classificadas:

3.2.1. Quanto ao extrato primitivo:

a) Cerveja leve: definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a 5% e menor que 10,5% em peso, podendo denominar-se cerveja *light* a cerveja leve que cumpra também, cumulativamente, os requisitos constantes dos itens 1 e 2, seguintes:

1. Redução de 25% do conteúdo de nutrientes ou do valor energético com relação a uma cerveja similar do mesmo fabricante (mesma marca comercial), ou do valor médio do conteúdo de três cervejas similares conhecidas e que sejam produzidas na região;

2. Valor energético da cerveja pronta para o consumo deve ser no máximo de trinta e cinco quilocalorias por cem mililitros.

b) Cerveja ou cerveja comum: definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a 10,5% e menor que 12% em peso;

c) Cerveja extra: definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a 12% em peso e menor ou igual a 14% em peso;

d) Cerveja forte: definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior que 14% em peso.

3.2.2. Quanto à cor:

a) Cerveja clara: a que tiver cor correspondente a menos de 20 unidades EBC (*European Brewery Convention*);

b) Cerveja escura: a que tiver cor correspondente a 20 ou mais unidades EBC (*European Brewery Convention*);

c) Cerveja colorida: a que, pela ação de corantes naturais, apresentar coloração diferente das definidas no padrão EBC (*European Brewery Convention*).

3.2.3. Quanto ao teor alcoólico:

a) Cerveja sem álcool: quando seu conteúdo em álcool for menor ou igual a 0,5% em volume, não sendo obrigatória a declaração no rótulo do conteúdo alcoólico;

b) Cerveja com álcool: quando seu conteúdo em álcool for superior a 0,5% em volume, devendo obrigatoriamente constar no rótulo o percentual de álcool em volume.

3.2.4. Quanto à proporção de malte de cevada:

a) Cerveja de puro malte: aquela que possuir 100% de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;

- b) Cerveja: aquela que possuir proporção de malte de cevada maior ou igual 50% cento em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;
- c) “Cerveja de...”, seguida do nome do vegetal predominante, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior que 20% e menor que 55% em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.

3.2.5. Quanto à fermentação:

- a) de baixa fermentação;
- b) de alta fermentação.

Araújo, Silva e Minim (2003) definem a cerveja como uma das bebidas mais delicadas e quimicamente instáveis, que possuem aroma e sabor complexos, porém, moderados. O fator determinante da aceitação e qualidade da bebida é o equilíbrio de seus compostos voláteis e não voláteis, tais como ésteres, aldeídos, dicetonas vicinais, ácidos orgânicos, álcoois superiores, fenóis, iso- α -ácidos e outros compostos.

Conforme Siqueira, Bolini e Macedo (2008), a cerveja é classificada em dois grandes grupos: *ale e lager*. As cervejas do tipo *ale* são produzidas a partir da fermentação de superfície ou “alta”. Geralmente, são de cor clara, sabor acentuado de lúpulo, pouco ácidas e o teor alcoólico varia de 4% a 8%. Como exemplo dessa categoria, destacam-se a Porter e a Stout. Já as cervejas denominadas como *lager* são fabricadas por fermentação profunda ou “baixa”. As mesmas possuem cor clara, sabor suave e teor alcoólico entre 4 e 5%. A Pilsen, Munique e a Bock são umas das principais cervejas do tipo *lager*.

A maioria das cervejas do Brasil é do tipo *lager*, sendo também a mais comum em todo mundo. Essa popularidade deve-se as suas características mais adequadas ao nosso clima (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Do ponto de vista nutricional, a cerveja contém quantidades significativas de vitaminas do complexo B, principalmente folatos, riboflavina, e selênio (LUGASI, 2003).

3.3. Matérias - primas da cerveja

Com exceção da Alemanha, os demais países produtores de cerveja fabricam o produto com três matérias-primas básicas (água, malte e lúpulo), podendo ainda utilizar adjunto. A levedura não é considerada como matéria-prima, pois sua função é atuar como agente de transformações bioquímicas (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

3.3.1. Água

Esta matéria-prima é muito utilizada na produção da cerveja, tanto que a mesma contém mais de 90% de água (HILL, 2009). Além de ser utilizada durante várias etapas do processo, a mesma é responsável por diversas características de sabor e cor do produto final (CETESB, 2005). Oetterer, Regitano-D'Arce e Spoto (2006) também relatam sobre a qualidade da matéria-prima supracitada, abordando que os minerais influenciam diretamente na qualidade da cerveja e que a proporção entre os principais sais solúveis, tais como, bicarbonato, cloreto, sulfato de sódio, cálcio e magnésio, afetam a cor e o sabor da bebida.

Conforme Venturini Filho e Cereda (2001), para ser considerada como uma água cervejeira adequada é importante que alguns requisitos sejam atendidos, tais como, ser potável, transparente, incolor, inodora e isento de qualquer sabor estranho. Caso, a água seja de superfície, pode tornar-se indispensável um tratamento, visando reduzir ou até mesmo, eliminar matéria orgânica. Além disso, para ser de boa qualidade, a água deve apresentar, na fonte, alcalinidade máxima de 50 ppm. Atendendo esse limite, torna-se possível trabalhar com pH na faixa de 4 a 9 e deve ainda possuir em torno de 50 ppm de cálcio. Sendo importante relatar que o teor de cloreto de sódio (NaCl) varia em função da preferência de sabor.

Conforme relatam Briggs *et al.* (2004), os requisitos estabelecidos podem ser divididos em quatro grupos: “estética” (cor, turbidez, odor e sabor) e padrões microbiológicos (ausência de patogênicos), níveis de materiais orgânicos e inorgânicos que estão em solução e a presença de materiais radioativos.

Ainda de acordo com Briggs *et al.* (2004), existem alguns parâmetros estabelecidos para assegurar a qualidade da água e outros que variam de acordo com o tipo de cerveja, por exemplo, os níveis de íons de cálcio e sulfato podem ser mais elevados na água utilizada para produção da cerveja *Burton-on-Trend* conforme mostrado na Tabela 3.1. As limitações nos níveis de amônia/amônio e nitrogênio são estabelecidas, visto que estes compostos são frequentemente indicadores de contaminação com matéria orgânica em decomposição. Os níveis de nitrato, que variam amplamente, são motivos de preocupação, uma vez que as fontes de água estão cada vez mais contaminadas por esse composto oriundo de fertilizantes agrícolas lixiviados. A necessidade de limitar quantidades de íons tóxicos é óbvia, apesar de a levedura necessitar de traços de muitos deles, incluindo cobre, zinco, manganês e ferro. Os

níveis mínimos de dureza e alcalinidade são determinados para limitar a corrosão em tubulações.

Tabela 3.1- Composição da água dos principais centros cervejeiros (ppm).

	Teores (ppm)					
	Na ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	SO ₄ ⁻²	HCO ₃ ⁻
Burton-on-Trent	54	24	352	16	820	320
Pilsen	32	8	7	5	6	37
Munique	10	19	80	1	6	333
Londres	24	4	90	18	58	123
Dublin	12	4	119	19	54	319
Dortmund	69	23	260	106	283	549

Fonte: Hough (1985).

É muito importante que o pH da água seja controlado, pois um pH alcalino provoca a dissolução de materiais, que são encontrados no malte e nas cascas da cevada além de serem indesejáveis durante o processamento. O pH da água ideal para a fabricação da cerveja situa-se na faixa de 6,5 a 7,0. No entanto, o que estabelece o pH ideal é o tipo de cerveja a ser produzido. Deve-se levar em consideração que é necessário obter uma relação ácida, que facilite a atividade enzimática com um consequente aumento no rendimento de maltose, e um maior teor alcoólico (AMBEV, 2014).

De acordo com Venturini Filho (2000), é importante que a indústria cervejeira seja implantada em local próximo a uma fonte abundante de água de boa qualidade, visto que, à medida que mais correções são requisitadas para se obter uma água adequada, aumentam-se os custos do produto final. No entanto, segundo CETESB (2005), devido a sistemas de tratamento mais disponíveis e diversificados, a qualidade da água captada deixou ser uma questão estratégica no setor cervejeiro, ainda que isso demande custo de tratamento, que podem ser desde a decantação com sulfato de alumínio e desinfecção com hipoclorito até sistemas avançados como osmose reversa e filtração.

3.3.2. Cevada e malte

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) originou-se no Oriente Médio, e mundialmente, é considerada como o quinto grão mais importante, superado pelo arroz, milho, trigo e soja. Com uma quantidade anual média em torno de 140 milhões de toneladas, a concentração da produção está mais voltada para as regiões temperadas da Europa, Ásia e América do Norte (MORI; MINELLA, 2012). Conforme Minella (2013), em relação à produção brasileira de cevada para fins cervejeiros está concentrada nos três estados da Região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná).

A cevada pode ser classificada de acordo com a disposição dos grãos na espiga de duas ou seis fileiras. As espigas constituídas com duas fileiras produzem grãos maiores, mais uniformes, ricos em amido. Em contrapartida, as espigas de seis fileiras possuem grãos menores, com baixo teor de amido, no entanto, têm maior teor de proteínas e enzimas. É fundamental destacar que nas cervejarias, a maior quantidade de casca beneficia a produção de meio filtrante e as proteínas liberam mais aminoácidos que favorecem a fermentação. No entanto, a escolha do tipo de cevada a ser utilizada depende das exigências da cervejaria (LIMA, 2010). A composição aproximada do malte é mostrada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Composição aproximada do malte.

Componentes	Peso seco (%)
Amido	58
Sacarose	4
Açúcares redutores	4
Hemicelulose	6
Celulose	5
Lípidos	2
Proteínas	12
Aminoácidos/peptídeos	1
Minerais	2
Outros	6

Fonte: Hutkins (2006).

De acordo com Almeida (2014), no Brasil, a indústria de cerveja utiliza a cevada a fim de obter o malte, que é designado como um termo técnico utilizado para conceituar a matéria-prima oriunda da germinação de qualquer cereal, tais como, trigo e centeio entre outros cereais sob condições controladas. No entanto, de acordo com Venturini Filho e Cereda

(2001), apesar da possibilidade de uso de outros cereais para a produção da cerveja, é necessário destacar que a cevada é o cereal que possui alto teor de amido (extrato fermentável) e proteínas em qualidade e quantidade necessária para nutrição das leveduras. Além disso, apresenta menores problemas durante o processo de maltagem. Outros cereais como o malte de milho apresenta problema de ranço de sua fração lipídica; já o trigo sofre ataque de microrganismos, que crescem na superfície do grão.

Conforme Botelho (2009), o processo de maltagem é dado pela germinação dos grãos de cereais sob condições controladas. Isto possibilita o desenvolvimento enzimático a partir da formação e ativação de enzimas, que não se encontram presentes no cereal não maltado, degradação de alguns compostos, tais como, amidos e proteínas e a formação de compostos resultantes da reação de Maillard, que influenciam na cor e no sabor da cerveja. Segundo Lima, (2010), o malte é definido como o grão de cevada germinado a partir do controle de umidade, agitação e temperatura, favorecendo o máximo a produção de enzimas, que são capazes de hidrolisar o amido da semente. Quando é utilizado outro cereal para a produção de bebidas alcoólicas, ou etanol, comumente, denomina-se por malte, acompanhado da indicação do cereal, por exemplo, malte de milho.

O processo de maltagem, de acordo com Oetterer, Regitano-D'Arce e Spoto (2006) envolve as seguintes etapas: germinação e secagem dos grãos. A cevada, inicialmente, é colocada sob maceração em água até os grãos alcançarem umidade em torno de 45% a fim de que ocorra a germinação dos mesmos. Esta etapa é desempenhada sob condições controladas de temperatura, umidade e aeração e é através da mesma que ocorre a produção de enzimas necessárias durante a produção do mosto cervejeiro. Após estarem convenientemente germinados, os grãos são submetidos a uma temperatura em torno de 70°C até aqueles atingirem um teor de umidade correspondente a 10%, dando origem ao malte seco.

3.3.3. Lúpulo

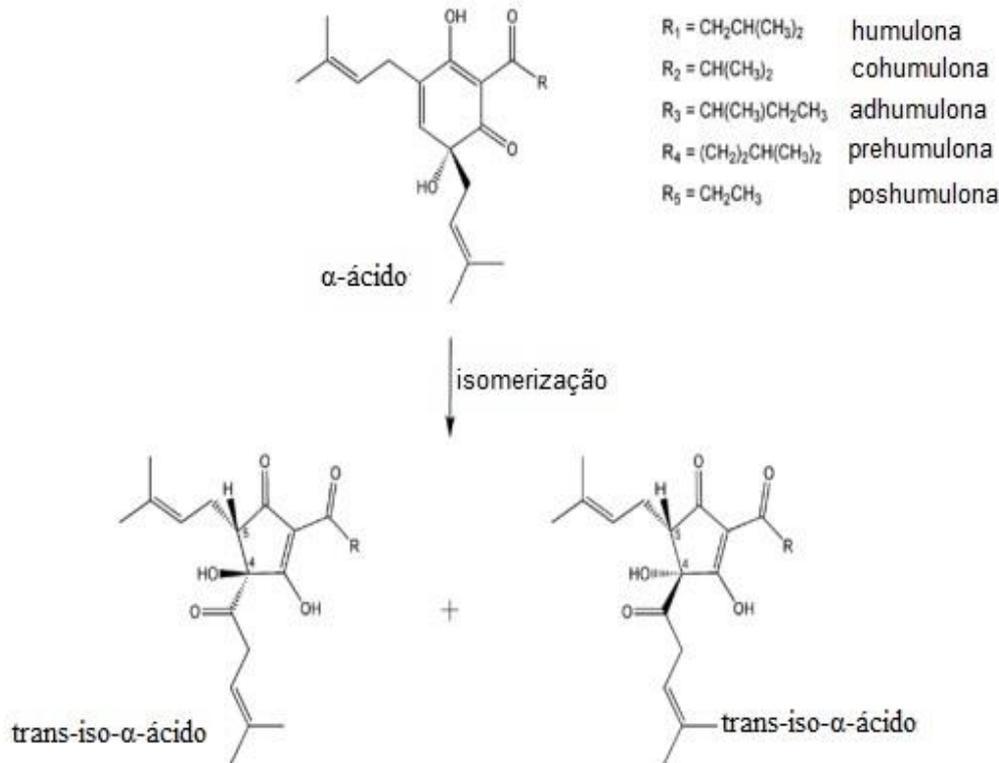
De acordo com Hough (1985), Briggs *et al.* (2004) e Regitano-D'Arce e Spoto (2006), o lúpulo é uma planta dioica, ou seja, possui flores masculinas e femininas, pertence à espécie *Humulus lupulus* e à família *Cannabaceae*, originária de zonas temperadas. O lúpulo foi utilizado pela primeira vez devido a seu valor conservante, porém a continuação de uso deve-se a seu papel em duas qualidades sensoriais da bebida, a aromática e a que propicia

o sabor amargo. A característica aromática é proveniente dos óleos essenciais e a característica do amargor é oriunda das resinas amargas. Estes componentes estão presentes nas glândulas de lupulina. E estas, por sua vez, são encontradas nas flores femininas e nos frutos recorrentes. Sendo importante destacar que não existe apenas um único composto químico, que confere o amargor da cerveja, o mesmo é resultante de uma mistura de vários ácidos e resinas, que se modificam a partir dos efeitos do oxigênio, do calor e da umidade.

Conforme Keukeleire (2000), talvez a classe mais importante de componentes do lúpulo são os ácidos, que são classificados como: α -ácidos e β -ácidos. Esses dois grupos incluem três constituintes humulona e lupulona, cohumulona e colupulona, adhumulona e adlupulona, os quais diferem quanto à natureza da cadeia lateral, que é derivada respectivamente a partir dos aminoácidos hidrofóbicos: leucina, valina e isoleucina. Esses ácidos representam conteúdo acima de 25%, ou ainda mais, do peso seco dos cones do lúpulo. As proporções relativas dependem muito da variedade da matéria-prima e das condições de cultivo. Os ácidos do lúpulo são ácidos fracos, exibem solubilidade baixa em água e quase não possuem sabor amargo.

Segundo Hughes (2009), grande parte do amargor da cerveja, conforme mencionado anteriormente, deve-se principalmente aos compostos denominados ácidos iso-alfa, que são misturas de seis componentes principais, equivalentes a três pares de estereoisômeros de compostos derivados de cada um dos três α -ácidos do lúpulo. Os α -ácidos são isomerizados a iso- α -ácidos durante o estágio de fervura do mosto. Os β -ácidos não sofrem isomerização, formando produtos de degradação amargos (huluponas), quando presentes durante o processo de fervura do mosto. No entanto, na prática, esta contribuição para o amargor é de importância menos expressiva. A Figura 3.1 mostra a conversão do α -ácidos em iso- α -ácidos via isomerização.

Figura 3.1 - Estrutura química de α -ácidos e conversão de α -ácidos por isomerização.



Fonte: Caballero, Blanco e Porras (2012).

De acordo com Botelho (2009) e Keukeleire (2000), a ação antisséptica da matéria-prima deve-se aos ácidos iso-alfa, pois estes são bacteriostáticos e contribuem para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja. Os ácidos inibem fortemente o crescimento de bactérias gram-positivas devido à ação do grupo prenil, presente nas cadeias laterais desses compostos, sobre a membrana plasmática, inibindo fortemente o seu crescimento.

Conforme Cruz (2007), o lúpulo, por apresentar componentes facilmente oxidáveis, requer muito cuidado durante sua recolha, tratamento subsequente e armazenagem. Então, com intuito de assegurar a boa qualidade da matéria-prima, adotam-se formas de emprego industrial bastante estáveis e passíveis, algumas, de armazenagem à temperatura ambiente. Sendo as mais conhecidas os extratos obtidos por extração pelo CO_2 supercrítico e por etanol e as peletes, que são oriundas do prévio enriquecimento das inflorescências em lupulina a partir da eliminação de pedúnculos e algumas brácteas, moagem em moinhos refrigerados e peletização. A Tabela 3.3 apresenta os principais constituintes do lúpulo em flor.

Tabela 3.3 - Composição do lúpulo em flor.

Compostos	Quantidade (g/100g)
Ácidos α	2 – 17
Ácidos β	2 – 10
Óleos essenciais	0,5 – 3
Polifenóis e taninos	3 – 6
Monossacarídeos	2
Aminoácidos	0,1
Proteínas	15
Lipídeos e ácidos graxos	1 – 5
Pectinas	2
Cinzas	10
Celulose – lenhinas	40 – 50
Água	8 – 12

Fonte: Cruz (2007).

Segundo Hutkins (2006), o teor de amargor contribuído pelo lúpulo é expresso em termos de Unidade Internacional de Amargor (IBU). Um IBU equivale aproximadamente 1mg de ácidos iso- α por litro de cerveja.

3.3.4. Adjuntos

O malte de cevada pode ser substituído parcialmente por grãos adjuvantes, como açúcares, diferentes melados, misturas contendo amido, assim como outros tipos de adjuntos (SOHRABVANDI *et al.*, 2010). Conforme Venturini Filho e Cereda (2001), os adjuntos podem ser sucintamente definidos como materiais que têm o papel de fornecer carboidratos para o mosto cervejeiro, desde que permitidos por lei. Podem ser usados porque produzem extratos mais baratos do que o malte e/ou concedem características desejáveis ao produto, por exemplo, diluem os níveis de nitrogênio e taninos polifenólicos, permitindo assim o uso de maltes ricos em proteínas e a produção de uma cerveja menos propensa a tornar-se turva. BRIGGS *et al.* (2004) e Botelho (2009) relatam que com o uso de adjuntos, as cervejas adquirem alta estabilidade física, melhor resistência ao resfriamento e maior brilho. A maior estabilidade física refere-se ao fato de que os adjuntos contribuem pouco com material proteico para o mosto e a cerveja, o que é vantajoso em termos de estabilidade coloidal.

Os principais fatores determinantes da aceitabilidade de um adjunto cervejeiro com elevada qualidade para a produção de cerveja são os seus componentes químicos, como

amido, proteínas, sais minerais, cinzas e lipídeos, com o objetivo de produzir um mosto que tenha a composição desejada de carboidratos em solução e, conseqüentemente, obter uma boa fermentação (BRIGGS *et al.*,2004).

Segundo Venturini Filho e Cereda (2001), podem-se classificar os adjuntos de acordo com sua composição química como: amiláceos e açucarados. Lewis e Bamforth (2006) exemplificam principalmente milho, arroz, cevada, trigo e sorgo como adjuntos amiláceos, que necessitam ser submetidos ao processo de aquecimento para hidrólise do amido antes de fazer parte do mosto. Em relação aos adjuntos açucarados, têm-se, os xaropes açucarados, os quais podem ser adicionados diretamente no mosto, uma vez que durante sua produção já ocorre a hidrólise do amido. Estes adjuntos são altamente valiosos porque eles podem ser utilizados para aumentar a densidade do mosto e o nível de açúcares fermentescíveis.

Briggs *et al.* (2004) também separam os adjuntos, porém de acordo com a etapa onde são adicionados ao processo cervejeiro em:

- adjuntos adicionados na tina de mosturação: são aqueles derivados de cereais, fundamentalmente milho e arroz, mas que têm que ser hidrolisados no processo de mosturação.

- adjuntos adicionados na tina de fervura: são geralmente xaropes, sendo o milho o cereal mais utilizado na fabricação destes adjuntos. Os xaropes são adquiridos pela cervejaria já hidrolisados, possibilitando sua adição numa etapa mais avançada do processo.

Dragone e Almeida e Silva (2010) destacam outros adjuntos não convencionais como arroz preto, banana, pupunha, pinhão e caldo de cana.

A legislação estabelece a quantidade de adjuntos a ser utilizada na produção de cerveja, no entanto, é importante destacar que segundo Venturini Filho (2000), cada empresa define a proporção de malte e adjunto na cerveja, conforme lhe convém. Isso se deve ao acompanhamento da tendência mundial que objetiva o aumento de adjuntos por parte das cervejarias, porém, deve-se levar em consideração que o uso excessivo deles pode resultar em cerveja com características indesejáveis como pouco encorpada e com má qualidade de espuma. Briggs *et al.* (2004) relatam que quanto maior for a proporção de adjuntos utilizados no mosto, maior a dificuldade de obter boa recuperação do extrato, maior será a viscosidade do mosto e maior será o tempo de filtração. Além dos problemas descritos, os níveis de nitrogênio solúvel e amino nitrogênio livre (FAN) podem diminuir até níveis que impeçam o crescimento das leveduras e a fermentação de forma satisfatória.

Carvalho *et al.* (2009) utilizaram suco de banana como adjunto do malte, e a partir do controle e dos parâmetros fermentativos durante a fermentação primária dos seguintes tipos de mostos: puro malte (12 °P), com adjunto de banana (12 °P) e com adjunto de banana (15 °P), pode-se observar que a adição da polpa beneficiou o processo fermentativo, por exemplo, o mosto puro malte (12 °P) apresentou tempo de fermentação igual a 75,5h, teor de etanol (4,74% v/v), produtividade de etanol (Qp) igual a 0,5g/L.h e Yp/s (0,43g/g). Ao passo que o mosto com adjunto (12 °P) obteve 72 h de fermentação, teor de etanol (5,3%), Qp (0,58 g/L.h) e Yp/s (0,45 g/g).

Santos (2011) avaliou o emprego do arroz preto (*Oryza sativa* L.) submetido à hidrólise enzimática como adjunto na fabricação de cerveja, sendo utilizados 45% do adjunto (arroz preto) no extrato primitivo. O processo fermentativo apresentou um bom rendimento fermentativo (0,37 g/g), eficiência de fermentação (72,48%), produtividade em etanol (0,32 g/L.h) e a bebida apresentou sabor agradável e intenso, similar às cervejas consumidas no inverno.

Brunelli, Mansano e Venturini Filho (2014) caracterizaram físico-quimicamente cervejas elaboradas com mel. Os ensaios de produção de cerveja foram feitos com nove tratamentos, combinação de três concentrações de extrato original (11, 13 e 15 °Brix) e três porcentagens de mel na formulação do mosto (0%, 20% e 40%). O uso de mel na formulação das cervejas promoveu o aumento da carbonatação e da densidade de espuma, bem como a diminuição da turbidez, cor, acidez e amargor. Por outro lado, o aumento nas concentrações de extrato primitivo no mosto acarretou a elevação nos teores de acidez total, cor e turbidez nas cervejas. As cervejas produzidas com mel apresentaram maiores teores alcoólicos e menores valores do extrato aparente e do extrato real.

Matos *et al.* (2005) utilizaram fécula de batata como adjunto de malte na fabricação da cerveja, buscando comparar o rendimento da mosturação utilizando amido de milho e fécula de batata. A hidrólise do amido de milho disponibilizou mais açúcares solúveis comparado com a fécula de batata. Esta, porém, por apresentar teor alto de proteínas e lipídeos diminui o risco de turvação e melhora a estabilidade da espuma, reduzindo assim o gasto com uso de estabilizantes.

Curi, Venturini Filho e Nojimoto (2009) produziram cervejas tipo *Pilsen* utilizando cevada como adjunto do malte e as comparou com cervejas elaboradas a partir de puro malte. As proporções de malte e cevada foram: 80:20%, 60:40%, 50:50%. Observou-se que com o

uso crescente da cevada, houve redução da intensidade da cor, um aumento da estabilidade da espuma, porém interferiu negativamente na qualidade sensorial da cerveja.

Pinto (2015) produziu cerveja utilizando acerola (*Malpighia emarginata* DC) e abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) como adjunto no processamento de cerveja. A concentração ideal de cada adjunto foi analisada a partir de um tratamento estatístico (Delineamento Composto Central Rotacional), sendo as variáveis de saída os parâmetros físico-químicos e sensoriais. Através deste estudo, observou que as polpas de frutas quando adicionadas até um percentual de 16% ou a adição de altas concentrações da polpa de abacaxi (28%) com baixas concentrações de acerola (até 6%) conferem à bebida uma melhoria na qualidade dos atributos sensoriais e nas características físico-químicas. Sendo importante destacar que a concentração de etanol foi inversamente proporcional à concentração do suco de frutas.

Aizemberg (2015) empregou caldo de cana e do melado como adjunto do malte para produção de cervejas. Os mostos preparados com ou sem tratamento de clarificação possuíam concentrações diferentes (25% e 50% de caldo ou melado). A cerveja elaborada com 25% de melado de cana cru foi a mais aceita e escolhida para a produção em escala piloto. Sendo importante destacar que os quatro mostos constituídos com 50% de caldo ou 50% de melado, clarificados ou não, apresentaram maiores concentrações de etanol. Dentre estes, o mosto com 50% de caldo de cana cru obteve maior teor de etanol (8,04%) e maior concentração de células ($11,9 \times 10^7$ cel/mL).

3.3.4.1. Melão Caroá: Uma alternativa como adjunto no processo cervejeiro

Segundo Bisognini (2002), as Cucurbitáceas estão enquadradas entre as maiores e mais diversificadas famílias de plantas, as quais possuem uma variedade de frutos. São cultivadas mundialmente sob condições ambientais bastante variadas e estão associadas com a origem da agricultura e civilizações humanas, estando entre as primeiras espécies que foram domesticadas tanto no Antigo como no Novo Mundo.

De acordo com Teppener (2004), a família de planta *Curcubitaceae* é constituída de cerca de 120 gêneros e mais de 800 espécies cultivadas na área tropical. Rodrigues (2012) relata que no Brasil, são cultivados para fins alimentares, ornamentais ou como fonte de

matéria prima: abóboras (*Cucurbita*), chuchus (*Sechium edule*), melancias (*Citrulluslanatus*), melões (*Cucumis melo*), pepinos (*Cucumis sativus*), bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), porongos e cabaças (*Lagenaria siceraria*), além de outras culturas menos expressivas como kino (*Cucumis metuliferus*), maxixe (*Cucumis anguria*), melão-de-cheiro (*Sicana odorífera*), e melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*).

Em relação à importância econômica, as melancias, pepinos, melões e abóboras são as culturas principais, que representam 20% da produção total de produtos olerícolas no mundo (ALMEIDA, 2002).

Bisognin (2002) e Feijó (2005) retratam que as cucurbitáceas além de serem utilizadas como alimento para o homem desde a antiguidade até atualmente, os frutos de algumas espécies são utilizados para alimentação animal, como fontes de óleos, proteínas e fibras, assim como matéria-prima para fabricação de garrafas, instrumentos musicais, cachimbos, máscaras e esponjas que são utilizadas para higiene pessoal. De acordo com Romano *et al.* (2008), são importantes fontes de minerais e vitaminas A e C, que são encontrados na polpa dos frutos na forma de carotenoides e ácido ascórbico. São utilizados para fins medicinais, ornamentais, aromáticos ou como fonte de matérias-primas para diversos produtos.

Conforme Borges *et al.*(2007), *Cucurbitaceae* é uma família de suma importância para a alimentação, agrupando um grande número de espécies que apresentam alguns compostos com valor funcional reconhecido. Lima *et al.* (2010) abordam a existência de compostos tóxicos ou com potencial terapêutico, tais como cucurbitacinas, triterpenóides e tetracíclicos oxigenados. Conforme a farmacopeia, as cucurbitáceas exercem várias atividades farmacológicas como antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e muito mais. Possuem compostos tetracíclicos oxigenados que são responsáveis pela formação de espuma em solução aquosa.

Segundo Morton (1987), a planta *Sicana odorífera* pertence à família das Cucurbitáceas, acredita-se que é nativa do Brasil, e tem sido espalhada por toda a América tropical. Essa videira é perene, herbácea, de crescimento rápido. Lorenzi *et al.* (2006) especificam que a planta tem folhas simples, irregularmente lobadas, hirsuto-pubescentes, de 20-30 cm de diâmetro, flores solitárias, axilares, unissexuais de ambos os sexos presentes na mesma planta, formadas durante o período de junho a setembro. As sementes são ovais, borda marrom-clara com uma faixa castanho-escura (MONTANO *et al.*, 2007).

Ainda segundo Montano *et al.* (2007), o melão de caroá (Figura 3.2) é encontrado no Brasil, nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Figura 3.2 - Melão de Caroá (*Sicana odorifera* (Vell.) Naudim).



Fonte: Morton (1987).

É uma fruta também conhecida como melão de caboclo, melão coroá, caju cajuba, cajuá, cagou e cassabanana. É utilizada na medicina popular no combate a hipertensão, afecção de pele, anemia, hemorragia, desordem menstrual, doenças do útero, verminose e azia. É composta por ácido ascórbico, água, beta carotenos, cálcio, carboidratos, cinza, ferro, fibra, fósforo, gordura, niacina, proteína, riboflavina e tiamina (LIMA *et al.*,2010).

Lorenzi *et al.* (2006) ainda caracterizam os frutos como grandes, cilíndricos, pardos, vináceos ou pretos do tipo baga, com muitas sementes envoltas por polpa carnosa mole ou dura, amarela e aromática, de sabor adocicado, que amadurecem durante o verão. De acordo com Morton (1987), a fruta madura, finamente cortada, é comida *in natura*, especialmente no verão, quando é apreciada como refrescante. No entanto, ela é usada principalmente na cozinha para fazer geleia ou outras conservas. O fruto imaturo é cozido como um vegetal ou em sopas e ensopados. A fruta também é mantida em torno da casa, especialmente na roupa de cama e armários de roupas, por causa de sua fragrância duradoura, e acredita-se para repelir traças. Barbieri *et al.* (2006) relatam que os frutos são utilizados para o preparo de sucos e geleias e devido ao seu perfume intenso e agradável, semelhante ao aroma de maracujá e maçã e a sua durabilidade (em torno de seis meses) pós-colheita, são colocados no

interior de guarda-roupas ou em salas que permanecem por muito tempo fechadas, para aromatização do ambiente.

Na literatura existem poucos trabalhos relacionados ao fruto, tais como: Kienteka (2014) extraiu e caracterizou polissacarídeos dos frutos; Jaramillo *et al.* (2011) identificaram flavonoides antioxidantes e antocianinas na casca do melão; Parada, Duque e Fujimoto (2000) buscaram isolar e caracterizar compostos aromáticos livres e na forma de glicoconjugados envolvidos na formação do aroma da polpa dos frutos e Nakano *et al.* (2004) isolaram o composto Cucurbita-5,23-diene-3 β , 25-diol.

3.4. Microbiologia do processo cervejeiro

Conforme Sohrabvandi, Mortazavian e Rezaei (2011), o aspecto microbiológico da cerveja está relacionado com as leveduras cervejeiras, assim como com microrganismos contaminantes.

3.4.1. Leveduras

As leveduras são definidas como fungos unicelulares pertencentes a grupos taxonômicos distintos (SICARD; LEGRAS, 2011). Conforme Venturini Filho e Cereda (2001) estes fungos se apresentam sob a forma unicelular e geralmente, reproduzem-se pelo processo de brotamento. O crescimento destes fungos acontece mais rapidamente do que a dos bolores, sendo ainda, mais eficientes que estes na atividade metabólica. Diferem das algas por não realizarem fotossíntese; dos protozoários, pela presença de parede celular rígida; e das bactérias, devido a suas dimensões maiores e propriedades morfológicas.

Conforme Almeida Lima, Basso e Amorim (2001), as leveduras são os microrganismos bastante importantes na obtenção do álcool através da via fermentativa. Sendo a *Saccharomyces cerevisiae*, as leveduras utilizadas na fermentação alcoólica. Podendo classificá-las, segundo Pelczar, Chan e Krieg (1997), como microrganismos tipicamente gemulantes e suas cepas são utilizadas no processo fermentativo, por exemplo, para a

produção de bebidas alcoólicas. Geralmente, são de forma elipsoidal com dimensões características que variam de 6 a 8µm de comprimento por 5µm de diâmetro.

De acordo com Cruz (2007), a levedura cervejeira é pertencente ao grupo de ascoporogênicos, família dos *saccharomyceteeae*, gênero *Saccharomyces*. Na produção de cerveja, estirpes *Saccharomyces pastorianus* / *carlsbergensis* (leveduras de baixa fermentação), e de *Saccharomyces pastorianus* / *cerevisiae* (leveduras de alta fermentação) são utilizadas. Conforme Almeida e Silva (2005), apesar dessa classificação, os taxonomistas de leveduras têm considerado todas as cepas utilizadas na produção da cerveja como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*. Logo, a literatura científica se refere às leveduras como *S. cerevisiae* tipo *ale* e *S. cerevisiae* tipo *lager*, no entanto, existem algumas diferenças bioquímicas entre esses dois tipos de cepas de leveduras. As leveduras tipo *lager* possuem os genes MEL, os quais produzem a enzima extracelular α -galactosidase (melibiase), que possibilitam a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). Em contrapartida, as do tipo *ale* não apresentam esses genes, tornando inviável a utilização de melibiose. Outra diferença está relacionada à temperatura máxima de crescimento, pois as cepas *ale* podem crescer até 37°C, enquanto as cepas *lager* não apresentam crescimento com mais de 34°C.

Ainda segundo Almeida e Silva (2005), a cerveja *lager* é produzida por leveduras de baixa fermentação a uma faixa de temperatura de 7-15°C. Estas no final da fermentação primária (7 a 10 dias), floculam e são coletadas na base do fermentador. Já as leveduras de alta fermentação que são utilizadas para a produção de cervejas *ale* fermentam em temperaturas entre 18-22°C. Essas leveduras no final da fermentação (3 a 5 dias) são adsorvidas nas bolhas de CO₂ e são conseqüentemente, carregadas até à superfície, onde serão coletadas.

De acordo com Russel e Stewart (1995), o metabolismo eficiente dos constituintes do mosto em etanol e outros compostos da fermentação com intuito de produzir uma cerveja de qualidade e estabilidade satisfatórias depende de vários fatores, tais como:

- Características genéticas: seleção da cepa da levedura utilizada;
- Fisiologia celular: tolerância ao stress pelas células de levedura, assim como a viabilidade e vitalidade destas e a concentração celular do inóculo;
- Disponibilidade nutricional: a natureza e concentração do nitrogênio assimilável, a variedade e a concentração de açúcares no mosto e também a disponibilidade de íons metálicos;

- Condições físicas: pH, temperatura, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto;

É importante destacar que de acordo com Pillay, Maharaj e Olaniran (2011), o tipo de levedura influencia na qualidade da cerveja, especialmente, no que se refere à turbidez e à estabilidade da espuma.

O elemento mais abundante nas células de levedura é o carbono, o qual corresponde um pouco menos de 50% do peso seco. Outros grandes componentes elementares são o oxigênio (30-35%), nitrogênio (5%) e fósforo (1%). O conteúdo total de mineral corresponde a 5-10% do peso seco das células. As classes mais importantes de macromoléculas são proteínas (40-45% do peso seco de células), carboidratos (30-35%) e lipídeos (4-5%) (BRIGGS *et al.*, 2004).

3.4.2. Microrganismos contaminantes

Segundo Konings e Sakamoto (2003), a cerveja é um meio pobre e bastante hostil para grande parte dos microrganismos devido ao teor de etanol que varia de 0,5 a 10% (v/v), sendo normalmente de 4 - 5%; o pH de 3,8 – 4,7 , porém as bactérias requerem valores maiores para seu crescimento; a alta concentração de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5% v/v) e baixa concentração de oxigênio (< 0,1 ppm). Suzuki (2011) ainda relata que a cerveja é um meio pobre devido ao esgotamento dos nutrientes pelas leveduras durante o processo fermentativo. No entanto, sabe-se que os microrganismos são responsáveis por muitos defeitos que ocorrem no produto. Então, prevenir ou minimizar o acesso e o crescimento de microrganismos contaminantes durante todo processo de fabricação da cerveja é essencial para obtenção de uma bebida de boa qualidade (HUTKINS, 2006). Silveti *et al.*(2010) frisam que os efeitos oriundos da atuação desses organismos tem comprometido a qualidade do produto final, assim como gerado prejuízos financeiros para as indústrias cervejeiras.

Segundo Hill (2009), a maior parte dos contaminantes potenciais são originários de matérias-primas brutas e/ou dos equipamentos utilizados na produção da cerveja. Matérias-primas tais como malte, lúpulo e a água cervejeira podem ser contaminados por microrganismos e estes devem ser eliminados a fim de evitar à deterioração do mosto e conseqüentemente da cerveja.

Ainda conforme Hill (2009), o mosto é um meio rico em nutrientes e a disponibilidade de fatores que contribuem para o crescimento microbiano, tornam o mosto um *habitat* adequado para estes organismos. Os contaminantes mais comuns são as enterobactérias, bacterias acéticas, bacterias lácticas e leveduras selvagens. As enterobactérias podem se desenvolver durante o estágio inicial do processo cervejeiro causando *off-flavors* na cerveja. Elas são indiretamente os microrganismos deteriorantes da cerveja e os efeitos da contaminação incluem redução de nitrato, *off-flavors* indesejáveis, tais como sabor de vinagre, diacetil e sabores acidificados.

3.4.2.1. Leveduras selvagens

Conforme Cabrini e Gallo (1999), a levedura contaminante é definido como qualquer levedura presente no processo fermentativo, a qual não tenha sido selecionada para a produção de etanol. Esses organismos podem causar efeitos negativos, como redução do rendimento da fermentação alcoólica, maior tempo de fermentação, problemas operacionais, etc. No entanto, é preciso frisar que essas leveduras contaminantes podem apresentar bom desempenho fermentativo, podendo então, ser selecionadas para atuarem como leveduras no processo. Almeida e Silva (2005) especificam que se o contaminante se refere a outra levedura cervejeira, os principais problemas estão relacionados à velocidade de fermentação, atenuação final, floculação e paladar da cerveja. Em contrapartida, tratando-se de espécies não-cervejeiras que podem competir com a levedura de interesse pelos componentes do mosto, problemas como a produção de produtos de *off-flavor* semelhantes aos produzidos por bacterias podem ser acarretados.

Conforme Venturini Filho e Cereda (2001), algumas dessas leveduras são da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, outras são de outras espécies e há aquelas pertencentes a gêneros distintos, tais como *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* e *Brettanomyces*.

3.4.2.2. Bactérias

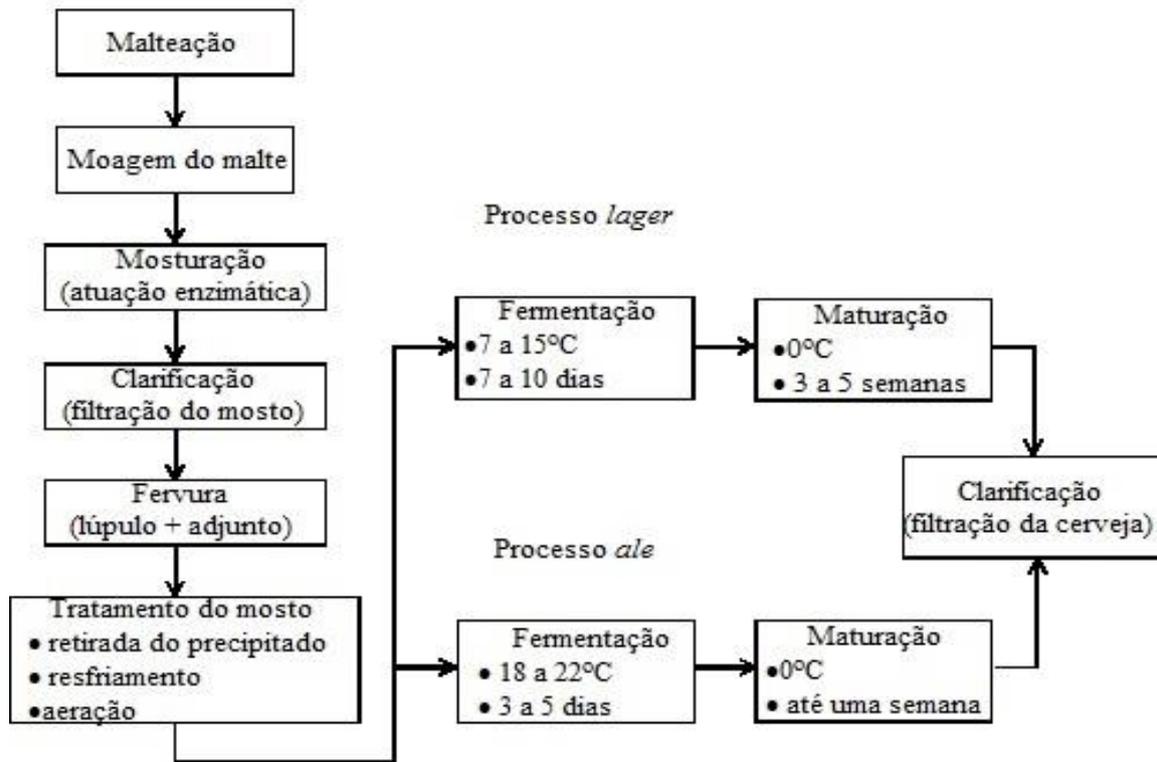
As bacterias são conceituadas como agentes danificadores da cerveja. E são divididas em dois grupos: gram-positivas e gram-negativas. Em relação às gram-positivas, as bacterias

láticas que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* acarretam maiores problemas para a cerveja (ALMEIDA e SILVA, 2005). Segundo Briggs *et al.* (2004), apesar da reação de coloração de gram, esse grupo de bactérias são distinguidas das gram-negativas porque as gram-positivas são menos resistentes ao efeito antiséptico das resinas do lúpulo, existindo as exceções dentro dos grupos. Suzuki (2011) também relata que as bactérias-láticas são as principais responsáveis por cerca de 60 a 90% da contaminação da cerveja. Entre as bactérias gram-negativas que causam alterações indesejáveis na cerveja, incluem-se as bactérias acéticas (*Acetobacter*, *Gluconobacter*), e certos membros da família das enterobactérias (*Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Obesumbacterium*), assim como também *Zymomonas*, *Pectinatus* e *Megasphaera*.

3.5. Processo cervejeiro tradicional

Conforme Linko *et al.* (1998), existem muitas variações no processo cervejeiro, uma vez que este depende do tipo de cerveja a ser produzida, por exemplo, as cervejas *ale* são produzidas com leveduras do tipo *ale*, logo o processo é diferenciado de cervejas do tipo *lager*. Os estágios do processo utilizado para a produção dos dois tipos de cerveja são mostrados na Figura 3.3 e descritos nos tópicos a seguir.

Figura 3.3 - Preparação dos principais tipos de cerveja.



Fonte: Adaptado de Russel (1994).

3.5.1. Produção do mosto

A produção do mosto engloba as etapas de malteação, moagem do malte, mosturação, clarificação e fervura.

3.5.1.1. Malteação

Jacobsen *et al.* (2002) definem a malteação como um processo no qual ocorre a transformação da cevada em malte. De acordo com McElroy e Jacobsen (1995), os objetivos específicos deste processo são a hidratação e a solubilização dos materiais presentes na parede celular do endosperma da semente; a solubilização moderada da matriz proteica; a produção de enzimas, tais como α -amilase, β -glucanase e a degradação enzimática limitada dos grânulos de amido do endosperma. O processo de malteação consiste de três etapas:

maceração (embebição), germinação e secagem. Conforme Hutkins (2006) a maceração consiste na etapa em que o grão de cevada é posto em contato com a água fria à temperatura entre 10 a 20°C durante dois ou três dias, aumentando seu teor de umidade de 10-12% para aproximadamente 45°C. Durante essa etapa, o material é bastante aerado para promover o processo de germinativo. A cevada úmida é então removida da água e incubada sob condições frias, úmidas e bem aeradas por um período de 2 a 8 dias. Inicialmente, a cevada intumescce, e então, germina de forma que as “radículas” ou brotos aparecem. De acordo com Boulton e Quain (2001), enquanto a germinação ocorre, endoglucanases, pentosanases, endoproteases e amilases são liberadas a partir da camada de aleurona e lentamente atravessam e degradam a estrutura celular do endosperma liberando assim grãos de amido. Nesse processo 75% das enzimas β -glucanas e 40% das proteínas são solubilizadas no endosperma. E surpreendentemente, apenas 10% do amido é degradado, restando toda massa para extração durante a produção do mosto. Logo, para estabilizar e preservar a atividade enzimática é necessário um processo de secagem, no qual a cevada “verde” germinada é secada gradativamente numa faixa de temperatura de 45 a 60°C para remover a água sem inativar as enzimas.

Na indústria cervejeira, a atividade das enzimas, as quais realizam a degradação do amido durante o processo de mosturação, é determinada como poder diastático, parâmetro este que se refere à capacidade do malte para hidrolisar o amido em açúcares fermentáveis (GEORG-KRAEMER; MUNDSTOCK; CAVALLI-MOLINA, 2001).

Ainda de acordo com Hutkins (2006), as principais enzimas responsáveis pela degradação do amido, sintetizadas durante a malteação, são a α -amilase e β -amilase.

3.5.1.2. Moagem do malte

Segundo Krottenthaler, Back e Zarnkow (2009), a decomposição mecânica do grão de malte ocorre a partir do processo de moagem, o qual conforme Almeida e Silva (2005) influencia diretamente a velocidade das transformações físico-químicas, o rendimento, a clarificação além da qualidade do produto final. De acordo com Bamforth (2003), o principal objetivo deste processo é produzir uma distribuição de partículas que é mais adequado para os processos subsequentes na cervejaria. Nessa etapa, grande parte do malte deve ser convertida em farinha, porém com partículas pequenas suficientes para permitir o acesso da água, a qual

provoca a hidratação das mesmas, provocando a ativação enzimática e a “solvatação” das moléculas de substratos (principalmente amidos) nos quais as enzimas atuam. É importante que as cascas sejam mantidas intactas para serem utilizadas como camada filtrante.

Para o malte ser considerado como bem moído, o mesmo deve possuir as seguintes características: ausência de grãos inteiros e partículas de endosperma aderidas à casca, maioria das cascas rasgadas longitudinalmente, endosperma reduzido a partículas pequenas e de tamanho uniforme e quantidade mínima de farinha fina (BOTELHO, 2009). De acordo com Venturini Filho e Cereda (2001), a produção de farinha fina deve ser mínima, uma vez que isso provoca a formação excessiva de material mucilaginoso durante o processo de mosturação, dificultando a filtração do mosto.

Ainda segundo Venturini Filho e Cereda (2001), existem dois tipos de moinhos: de rolos e de martelo, sendo que a escolha de um deles depende do grau de modificação do malte, do tipo de recipiente utilizado na mosturação, assim como do método de filtração do mosto. A moagem pode ser classificada em dois tipos: moagem seca e úmida, sendo que esta se difere da moagem seca devido à umidificação do malte, que torna a casca do mesmo mais maleável, obtendo-se no processo de moagem cascas mais íntegras e com poucos endospermas aderidos às mesmas.

3.5.1.3. Mosturação

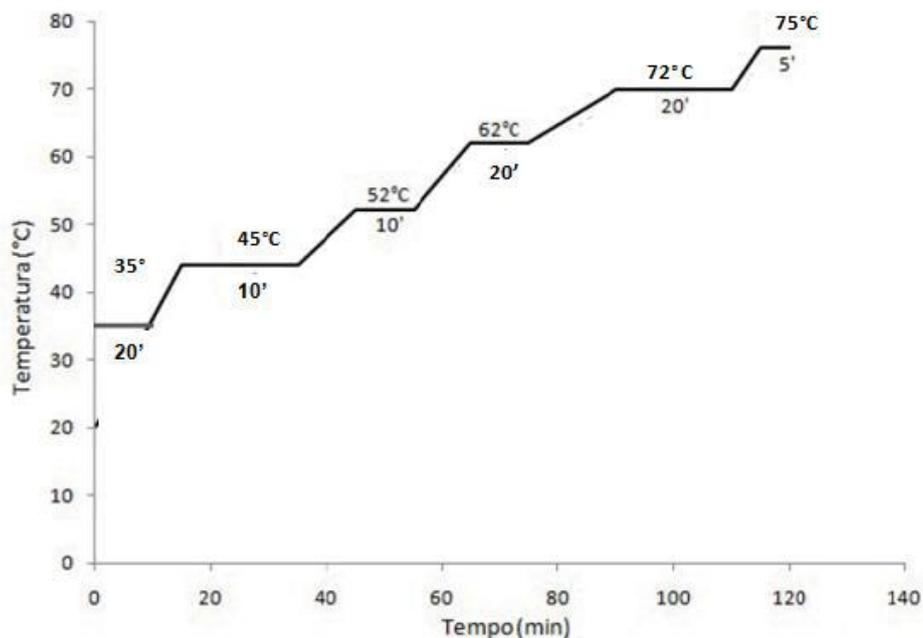
Nessa etapa, o malte moído é misturado com água, e então a mistura é aquecida. Muitos dos componentes do mosto surgem neste momento na solução, uma vez que são solubilizados. E outros são resultantes de reações entre as enzimas oriundas do malte e seus substratos, que se tornam possíveis devido à presença de um ambiente aquoso e de uma combinação apropriada de pH, temperatura e íons (BOULTON; QUAIN, 2001). Sendo importante frisar que segundo Almeida e Silva (2005), o pH inicial da solução deve ser ajustado em 5,4 a partir da utilização do ácido láctico e tamponado com CaCl_2 na proporção de 1,26g/Kg de malte.

Bamforfth (2003) destaca que a atuação enzimática é frequentemente iniciada com a temperatura relativamente baixa (45 a 50°C) a fim de ativar as enzimas mais termolábeis, como aquelas que degradam qualquer polissacarídeo encontrado na parede celular. De acordo

com Oetterer, Regitano-D'arce e Spoto (2006), entre a temperaturas de 45 e 55°C, ocorre a atuação das proteases sobre as proteínas, dando origem a peptídeos e aminoácidos. Já a sacarificação do amido tem início em temperaturas mais altas (60 a 75°C), ocorrendo a transformação de amidos em açúcares fermentescíveis, sendo os principais a maltose e as dextrinas (não fermentáveis). Mais especificamente, em temperaturas de 60 a 65°C, atuam as β -amilase, e nas temperaturas de 70 a 75°C; as α -amilases. Devido à ação das enzimas amilases sobre as ligações α -1,4 do amido, origina-se a maltose, que durante a fermentação, devido à ação da enzima maltase, será convertida em glicose. Já as dextrinas com ligações α -1,6 permanecerão sem se degradar, propiciando assim “corpo” à cerveja, colaborando também com o sabor e aroma.

Percebe-se que durante este processo enzimático é fundamental um controle rigoroso do tempo e da temperatura (BAMFORFTH, 2003). A Figura 3.4 mostra a variação da destas variáveis durante a mosturação. De acordo com Almeida e Silva (2005), o tipo de mosturação e o programa de tempo e temperatura utilizados durante a atuação enzimática são definidos a partir da composição e o tipo de cerveja a ser produzida.

Figura 3.4 - Tempo e temperatura utilizados na mosturação pelo processo de infusão.



Fonte: Adaptado de Carvalho e Zambiasi (2011).

De acordo com Hutkins (2006), a mosturação pode ser realizada pelo processo de decocção, infusão ou pela combinação dos dois métodos. O aquecimento por infusão é um processo simples, realizado passo a passo, no qual a mistura é aquecida a uma temperatura incremental mantida durante certo tempo, depois a mesma é elevada novamente, e assim por diante até a temperatura final ser alcançada. No aquecimento por decocção, uma parte da mistura é separada e submetida à fervura e depois a mesma é colocada novamente em contato com o mosto principal, assim ocorre o aumento da solução combinada. A principal vantagem deste processo é um aumento na extração do amido.

Na análise EBC, o “tempo de sacarificação” corresponde ao tempo em minutos tomados após a mosturação ter alcançado 70°C e quando a amostra não apresentar resultado positivo para o teste de iodo. Esta é realmente uma medida grosseira do tempo requerido para o amido ser dextrinizado e é largamente dependente do conteúdo de α -amilase do mosto (BRIGGS *et al.*, 2004). Almeida e Silva (2005) detalha que no final da mosturação, deve-se realizar o teste de iodo a partir da utilização de uma solução de iodo 0,2N. O indicador da ausência de amido é o desaparecimento da coloração roxo-azulada.

3.5.1.4. Clarificação (filtração do mosto)

Segundo, Botelho (2009), após o processo de mosturação, torna-se necessário realizar a separação do extrato líquido (mosto) dos sólidos presentes a fim de se obter um mosto clarificado e uma boa recuperação de extrato. Venturini Filho e Cereda (2001) relatam que o resíduo sólido que é composto pela casca do malte, fragmentos de aleurona, plúmula, restos de parede celular e proteína coagulada é utilizado como torta de filtração, através da qual o mosto será separado.

Segundo Medeiros (2010), a filtração consiste de duas fases. Na primeira, ocorre a obtenção do mosto primário; na segunda, acontece a remoção do extrato residual retido no resíduo a partir da lavagem do mesmo com utilização da água secundária. Almeida e Silva (2005) comenta que a água utilizada para lavagem deve estar a 75°C e que o processo de lavagem do resíduo auxilia também na elevação do rendimento do processo. Ainda conforme Venturini Filho e Cereda (2001), na temperatura em torno de 75°C, a viscosidade do mosto favorece uma separação eficiente do resíduo, as enzimas estão inativas, ausência de

desenvolvimento bacteriano, assim como, não ocorre extração de substâncias insolúveis das matérias-primas.

3.5.1.5. Fervura

Após o processo de filtração, de acordo com Boulton e Quain (2001), o mosto é submetido ao processo de fervura. O lúpulo é adicionado durante o tratamento térmico, sendo que na produção de cervejas que não é baseada na Lei *Reinheitsgebot*, faz-se a adição também de outras fontes de açúcares fermentáveis (adjuntos) na forma de xarope de açúcar.

Mosher (2009) relata que o processo de fervura envolve uma série de acontecimentos, tais como a esterilização do mosto, evitando que a cerveja seja contaminada por bactérias e leveduras selvagens; isomerização do lúpulo, tornando-o mais amargo e solúvel; coagulação do excesso de proteínas com o auxílio dos taninos (polifenóis) presentes nas partes vegetativas do lúpulo, originando o *trub*, o qual remove proteínas de cadeia longa, que de outro modo poderiam voltar a causar instabilidade ou o fenômeno denominado como *chill haze*, que é uma turvação inofensiva, mas desagradável que aparece quando a cerveja é servida fria; finalização de qualquer atividade enzimática remanescente e formação e eliminação de uma substância química denominada dimetil sulfeto (DMS). O precursor S-metil-metionina, presente no malte, à temperatura acima de 60°C, é convertido em DMS, o qual tem aroma de creme de milho. O DMS é um produto bastante volátil, fato este que facilita sua eliminação durante a fervura. No entanto, se logo após o processo de fervura, o mosto não for resfriado, ocorrerá sua formação que é muito rápida. Eblinger e Narzib (2012) ainda destacam que ocorre durante a fervura a formação de substâncias aromáticas, redutoras e corantes.

De acordo com Venturini Filho e Cereda (2001), a fervura deve ocorrer à pressão atmosférica durante 1 a 2h, devendo apresentar taxa de evaporação variando como volume de mosto por hora. O processo de fervura não pode ser muito extenso porque a reação de escurecimento não enzimática (reação de Maillard) pode apresentar efeitos negativos no que se refere à alteração da cor e do sabor.

3.5.2. Tratamento do mosto

Willaert (2007) relata que após a fervura do mosto, é necessário realizar a remoção do *trub* quente e dos detritos do lúpulo, garantindo a estabilidade coloidal e o sabor da cerveja. Caso não ocorra a remoção do *trub*, outros problemas podem ser acarretados, tais como aparecimento de película ao redor da parede celular das leveduras e sedimentação das mesmas durante a fermentação, conseqüentemente, o grau de fermentação será reduzido e serão conferidos à cerveja coloração escura, sabor áspero e uma pobre estabilidade da espuma. Bamforth e Lentini (2009) destacam que o *trub* gera impacto sobre o desempenho da levedura para eliminar carbonilas e produzir dióxido de enxofre.

Segundo Willaert (2007), existem diferentes processos para a retirada do *trub* do mosto, os quais se baseiam na separação de partículas com densidade e/ou tamanho diferentes. Incluem-se neste grupo a sedimentação, centrifugação e técnicas de filtração. Sendo que o processo de sedimentação é o mais simples, podendo-se utilizar um tanque de sedimentação ou um recipiente cilíndrico (*whirlpool*), em que o mosto é bombeado tangencialmente para seu interior, tendo-se início o vórtice.

De acordo com Briggs *et al.* (2004), depois da remoção do *trub*, o mosto é resfriado até a temperatura na qual a levedura será inoculada. Tradicionalmente, 15-22°C para *ale* e 6-12°C para *lager*, porém outras temperaturas são utilizadas. O processo deve ser realizado rapidamente e sob condições assépticas para interromper as reações químicas, assim como minimizar as possibilidades de crescimento de qualquer microrganismo contaminante. Bamforth (2003) relata que enquanto o mosto é resfriado, muitos sólidos precipitam. Sendo estes constituídos de proteínas e alguns lipídeos. Esse precipitado pode ser removido por floculação, flotação, centrifugação ou filtração.

De acordo com Briggs *et al.*(2004), após o resfriamento, o mosto é aerado ou oxigenado com intuito de fornecer oxigênio para a levedura no estágio inicial da fermentação. Eblinger e Narzib (2012) relatam que o oxigênio é introduzido na forma de ar e que a concentração requisitada para propagação da levedura deve estar em torno de 7 a 8 mg/L que corresponde a 80% de saturação do mosto com O₂. No entanto, quando o oxigênio puro for utilizado, o mesmo não deve exceder 15mg/L. Conforme Brányik *et al.* (2008), a aeração é importante para formação de componentes ativos do sabor e para a viabilidade celular , porém uma aeração intensa na etapa da fermentação primária e contínua causa a deterioração

do produto. O oxigênio solubilizado tem influência na formação de subprodutos da fermentação, tais como álcoois superiores, dicetonas, ésteres e acetaldeído.

3.5.3. Fermentação

Nessa etapa, a levedura é adicionada ao mosto previamente aerado, multiplicando-se rapidamente devido ao oxigênio dissolvido no meio, oxidando o piruvato a CO₂ e água. Assim, após todo o consumo de O₂, as leveduras por estarem em meio anaeróbico, iniciam o processo de conversão de açúcares em etanol e CO₂ (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008).

De acordo com Venturini Filho e Cereda (2001), a quantidade de levedura a ser adicionada no meio deve resultar numa concentração de 5 a 15 milhões de células por mililitro de mosto, sendo considerado como nível ótimo a grandeza de 10⁷ cel/mL.

Conforme Eblinger e Naziber (2012), os principais produtos resultantes da fermentação são o etanol e o dióxido de carbono. No entanto, outras reações ocorrem, e consequentemente alguns subprodutos tais como álcoois superiores alifáticos e aromáticos; ésteres; ácidos orgânicos; compostos carbonílicos e sulfurados e os álcoois polihídricos. E todos esses compostos influenciam na qualidade da cerveja. Stewart (2000) exemplifica na categoria de ácidos orgânicos, os ácidos cítrico, pirúvico, acético e succínico; e na dos compostos sulfurados, destaca o dimetil sulfeto e o dióxido de enxofre. Segundo Almeida e Silva (2005), as concentrações destes compostos variam de acordo com as condições do processo, como concentração, composição do mosto, temperatura e duração do processo fermentativo.

Ainda de acordo com Eblinger e Naziber (2012), durante a fermentação o pH decresce pelo menos em uma unidade devido aos ácidos orgânicos produzidos. O pH da cerveja varia entre 4,3 a 4,6.

As leveduras cervejeiras durante a fermentação, normalmente utilizam os seguintes açúcares: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose nesta ordem aproximada, podendo ocorrer mudança. Sendo importante frisar que os mostos cervejeiros possuem além dos açúcares supracitados, as dextrinas que são apenas utilizadas por *Saccharomyces diastaticus* (ALMEIDA e SILVA, 2005). A Tabela 3.4 mostra o perfil de açúcares do mosto de 11-12°P.

Tabela 3.4 - Perfil de açúcares no mosto 11 -12° P.

Açúcares do Mosto	Composição (%)
Maltose	50-60
Maltotriose	15-20
Glicose	10-15
Sacarose	1-2
Frutose	1-2
Dextrinas	20-30

Fonte: Stewart (2009).

Guido *et al.* (2004) relatam que o desempenho das leveduras na fermentação é influenciado por fatores externos, tais como a composição lipídica, oxigenação do mosto, temperatura, concentração celular, claridade do mosto, entre outros. No entanto, o estado fisiológico da levedura causa impacto sobre a estabilidade do sabor, uma vez que a habilidade da levedura para produzir dióxido de enxofre e reduzir compostos carbonílicos são os fatores envolvidos mais importantes. Lima *et al.* (2001) ressaltam como fatores que influenciam a fermentação alcoólica, os fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração de levedura e contaminação). De acordo com Briggs *et al.* (2004), a temperatura é o parâmetro que exerce efeito em todos os aspectos do crescimento, metabolismo e viabilidade de leveduras. Quanto maior for a temperatura de fermentação, menor será o tempo requerido para as leveduras consumirem os açúcares, isso acontece devido à influência deste fator na taxa metabólica dos microrganismos.

3.5.4. Maturação

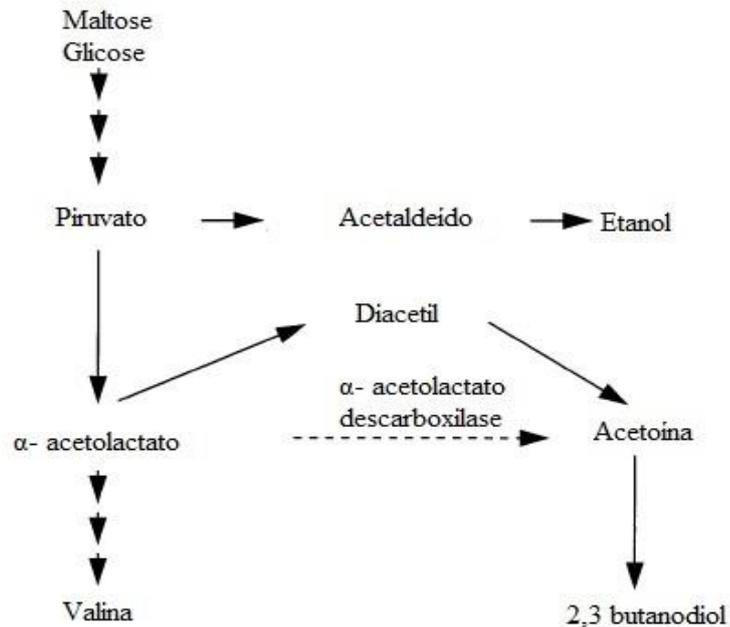
A cerveja antes de ser submetida à fermentação secundária (maturação) é denominada de cerveja verde, uma vez que ainda possui um sabor inaceitável e “imaturo”. Então, durante a maturação ocorre o refinamento dessa propriedade organoléptica (BRIGGS *et al.*, 2004). Willaert (2007) cita alguns fenômenos que ocorrem durante este processo, tais como sedimentação das células de levedura; melhoria da estabilidade coloidal; saturação da cerveja com dióxido de carbono; remoção dos componentes indesejáveis do aroma; excreção dos componentes ativos do sabor para conferir corpo à cerveja; fermentação do extrato

remanescente; melhoria da estabilidade da espuma, ajuste da coloração da cerveja, se necessário a partir da adição substâncias corantes, como o corante caramelo; ajuste do amargor, se necessário pela adição de produtos oriundos do lúpulo. Carvalho *et al.* (2007), destacam ainda a formação de ésteres acetato de etila, acetato de isoamila, caproato de etila e caprilato de etila dando origem ao aroma.

É imprescindível salientar que segundo Venturini Filho e Cereda (2001), para ocorrer a fermentação secundária e os benefícios provenientes dela, a cerveja verde deve conter um nível de extrato fermentável (0,5 a 1,5% m/m) e uma concentração de leveduras viáveis entre 2 a $5 \cdot 10^6$ cel/mL.

Conforme Linko *et al.* (1998), o subproduto principal da fermentação secundária é o diacetil, composto indesejável na cerveja, que de acordo com Eblinger e Naziber (2012), é formado através do seguinte mecanismo: durante a fase de propagação, as células de leveduras necessitam de grande quantidade de componentes nitrogenados para a formação da proteína celular, porém se não houver nitrogênio suficiente no mosto na forma de componentes, os quais são assimiláveis, a levedura tende a utilizar uma combinação do metabolismo de açúcares e proteínas. Linko *et al.* (1998) ainda detalham que a formação de diacetil a partir de α -acetolactato é uma reação não enzimática lenta. As reações subsequentes são enzimáticas: redução de diacetil a acetoína e a 2,3 butanodiol. Existe também uma rota enzimática que produz diretamente acetoína a partir de α -acetolactato, porém, infelizmente, as leveduras cervejeiras carecem da enzima α -acetolactato descarboxilase. Os dois casos são apresentados na Figura 3.5.

Figura 3.5 - Formação e degradação do diacetil na cerveja em maturação.



Fonte: Linko *et al.* (1998).

A maturação é conduzida em baixa temperatura, normalmente a 0°C durante 2 a 4 semanas. No entanto, a fim de reduzir o tempo do processo, buscam-se adotar novas técnicas, como a que envolve o “repouso de diacetil” que consiste em manter a cerveja entre 12 a 18°C por uma semana (repouso de diacetil) e em seguida, armazená-la a frio em torno de 0°C por mais uma semana (VENTURINI FILHO ; CEREDA, 2001).

Ainda de acordo Venturini Filho e Cereda (2001), é durante a etapa da fermentação secundária que ocorre a carbonatação da bebida, que pode ser resultante do gás carbônico produzido pela atividade da levedura e através de uma contrapressão de CO₂ de 0,8 a 1,0 atm no tanque de fermentação. Podendo-se utilizar ainda métodos mecânicos, como CO₂ recuperado a partir daquele produzido na fermentação da cerveja ou o gás obtido de empresas especializadas.

3.5.5. Clarificação (filtração da cerveja)

A clarificação da cerveja tem como objetivo obter a estabilidade, a qual pode ser dividida em três grandes aspectos: microbiológica, coloidal e a estabilidade do sabor. A estabilidade microbiológica é obtida através da remoção das células de leveduras; a coloidal refere-se à retirada de outras partículas maiores, principalmente aquelas formadas pela coagulação de compostos fenólicos e materiais proteicos que provocam o fenômeno denominado *chill haze* na cerveja clarificada à baixa temperatura. Em relação à estabilidade do sabor, esta é alcançada a partir da retenção de compostos que conferem o sabor e minimizam do oxigênio dissolvido na cerveja clarificada (GAN *et al.*, 2001).

Existem três técnicas básicas de clarificação que são utilizadas individualmente ou combinadas: substâncias clarificantes, centrifugação e filtração (MUNROE, 2006).

3.6. Bioquímica da fermentação

A fermentação alcoólica é definida como um processo que ocorre na ausência de oxigênio (anaeróbico) cujo objetivo é transformar açúcares em etanol e CO₂. Este processo envolve 12 reações em sequência ordenada, as quais são catalisadas por enzimas específicas. O processo é desempenhado, principalmente por leveduras com a finalidade de produzir energia para a realização de suas atividades fisiológicas, assim como para seu crescimento e reprodução (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Garcia-Cruz e Ernandes (2009) ainda definem o processo fermentativo como uma via catabólica em que ocorre a degradação de açúcar (glicose ou frutose) no interior da célula até a formação de etanol e CO₂, ocorrendo, conseqüentemente a liberação de energia química e térmica. A via central do catabolismo da glicose é denominada como glicólise, sendo o piruvato o produto final deste processo, o qual pode seguir as correspondentes vias metabólicas: fermentação alcoólica, láctea e respiração no Ciclo de Krebs e cadeia respiratória.

A fermentação alcoólica, de uma forma global, é representada pela Equação (1) de Gay-Lussac, na qual 1 mol de glicose (180g) produz 2 moles de etanol (92g), 2 moles de dióxido de carbono (88g) e 57 Kcal de energia (LEHNINGER *et al.*, 1995).



Os mostos que são obtidos apenas a partir do malte contêm como fonte de carbono os seguintes açúcares: sacarose, glicose, frutose, maltose, maltotriose e dextrinas (ALMEIDA e SILVA, 2005).

De acordo com Briggs *et al.* (2004), a sacarose é hidrolisada por uma enzima invertase que é secretada no periplasma da levedura, aumentando assim a concentração de glicose e frutose, açúcares estes que são primeiramente assimilados. Segundo Almeida e Silva (2005), quando 50% da glicose foi consumida pela levedura, iniciam-se a assimilação da maltose e maltotriose respectivamente. Então, ainda segundo Briggs *et al.* (2004), a maltose que é o carboidrato de maior quantidade no mosto, começa a ser metabolizada e quando esta atinge um nível indetectável, a maltotriose começa a ser assimilada. Vidgren (2010) relata que a maltose e maltotriose são utilizadas por último devido ao fato da glicose ser a principal fonte de carbono e de energia para a levedura.

De acordo com Walker (1998), a absorção da maltose envolve dois sistemas: transportadores de maltose dependente de energia (ATP convertido em ADP), os quais transportam a maltose intacta através da membrana celular e a maltase (α -glucosidase), a qual hidrolisa maltose internamente a fim de obter duas moléculas de glicose. A maltotriose, por sua vez, tem um independente transportador o qual depende de energia para o transporte intacto, mas compartilha a α -glucosidase, a qual hidrolisa o açúcar em três unidades de glicose.

Conforme Cruz (2007), as estirpes de leveduras cervejeiras são anaeróbios facultativos, podendo assim metabolizar a glicose e outros açúcares tanto em condições anaeróbicas como aeróbicas. Nas condições de aerobiose, o catabolismo da glicose pode ser realizado mediante a fermentação ou a respiração. No entanto, em condições de anaerobiose, apenas a fermentação ocorre. Em termos de energia, é mais favorável respirar do que fermentar, então, as leveduras fermentam o menos possível (efeito Pasteur). Porém, nas estirpes cervejeiras, o efeito Pasteur encontra-se normalmente ausente, estando presente outro efeito, denominado de *Cabtree*, que devido à alta concentração inicial de açúcares do mosto, ocorre a repressão catabólica do metabolismo oxidativo na *Saccharomyces cerevisiae*.

Algumas vezes, a maltose e maltotriose permanecem não fermentadas no final da fermentação primária, diminuindo assim a eficiência do processo tendo impacto sobre a qualidade do produto. Quando há uma determinada concentração de glicose no meio, a assimilação desses açúcares fermentáveis é dificultada devido à repressão catabólica e

inativação catabólica de enzimas e transportadores que são úteis para a utilização destes açúcares (VIRDGREN, 2010). Briggs *et al.* (2004) destacam que a presença da glicose no mosto impede a utilização do açúcar predominante (maltose), ressaltando que em mostos puro malte este problema tem importância menos significativa, uma vez que a concentração da glicose é baixa quando comparada à da maltose. Stewart (2006) afirma que a repressão ocorre pela alta concentração de glicose (>1% m/v).

A eficiência de estirpes de levedura cervejeira para efetuar a fermentação alcoólica depende de sua capacidade de utilizar açúcares presentes no mosto. Esta habilidade determina a taxa de fermentação, assim como a qualidade final da cerveja produzida. Com o objetivo de otimizar a eficiência da fermentação primária, é necessário um conhecimento minucioso sobre a cinética de consumo de açúcares, que está associado à cinética do crescimento de levedura (WILLAERT, 2007).

Durante a fermentação primária, de acordo com Hiralal, Olaniran e Pillay (2014), outros compostos como álcoois, ésteres, ácidos e aldeídos são produzidos. Segundo Pires *et al.* (2014) os ésteres, os álcoois superiores e as dicetonas são os elementos mais importantes produzidos na fermentação, uma vez que influenciam muito na qualidade da cerveja.

Os ésteres, de acordo com Cruz (2007), são os compostos que mais condicionam o *flavour* da cerveja, sendo formados principalmente na fase de crescimento das leveduras, mas 40% são formados apenas na fase estacionária. De acordo com Verstrepen *et al.* (2003), estes componentes são resultantes da reação de condensação intracelular entre um acetil-CoA e um álcool, catalisada pela enzima álcool acetil-transferase.

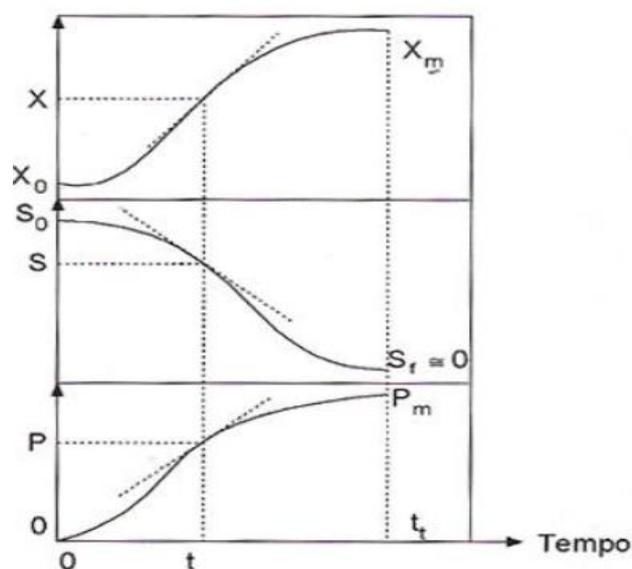
Os álcoois superiores, conforme Pires *et al.* (2014), podem ser formados pelo anabolismo ou catabolismo (via Erlich) de aminoácidos. Conforme Briggs *et al.* (2004), alguns destes álcoois podem também ser derivados da redução de aldeídos e cetonas presentes no mosto. Entre aqueles que contribuem para o *flavour* da cerveja incluem: n-propanol, iso-butanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol.

Segundo Briggs *et al.* (2004), as dicetonas vicinais são subprodutos da biossíntese dos aminoácidos valina e leucina, sendo que o diacetil (2-3 butanodiona) é a dicetona mais importante na cerveja, a qual confere sabor “amanteigado” à bebida. A formação deste composto encontra-se detalhada no item 3.5.4.

3.7. Cinética da fermentação alcoólica

Conforme Viegas (2003), o estudo cinético relacionado aos processos microbianos tem como intuito quantificar a taxa de crescimento celular, de consumo de substrato e a formação de produtos, assim como avaliar a influência de alguns fatores externos sob estes parâmetros. Na fermentação alcoólica, por exemplo, pode-se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol a partir da análise destes parâmetros cinéticos. Hiss (2001) relata que o estudo cinético tem inicialmente como objetivo a análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo do processo fermentativo. Estes componentes referem-se ao microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura. Tais valores experimentais de concentração (X , P e S respectivamente), quando representados em função do tempo, permitem os traçados das curvas de ajuste, que são indicadas por $X = X(t)$, $P = P(t)$ e $S = S(t)$. A Figura 3.6 é a representação clássica dos perfis das concentrações de substrato, produto e células em função do tempo de fermentação.

Figura 3.6 - Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação, onde X , P e S são as concentrações de microrganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente.



Fonte: Hiss (2001).

A partir dessas curvas é possível calcular as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e formação de produto (μ_p) através das tangentes.

Segundo Hiss (2001), para realizar um estudo cinético de um processo fermentativo, os seguintes parâmetros devem ser avaliados: velocidades instantâneas e específicas de transformação e os fatores de conversão. Entre estes fatores, a determinação do $Y_{p/s}$ (Eq.2), que consiste no fator de conversão de substrato em produto, é um dos mais importantes, uma vez que possibilita calcular a eficiência do processo fermentativo.

$$Y_{p/s}(\text{g/g}) = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad \text{Eq.(2)}$$

Onde p_0 e p correspondem respectivamente às concentrações inicial e final de etanol ; s_0 e s correspondem às concentrações inicial e final de substrato.

Outros parâmetros podem ser avaliados, como a produtividade volumétrica em etanol (Q_p), que segundo Borzani (1986) e Moser (1988) avalia a produção de etanol em um determinado tempo de acordo com a Eq. 3.

$$Q_p \left(\frac{\text{g}}{\text{L.h}} \right) = \frac{P-P_0}{t-t_0} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde p_0 e p correspondem respectivamente às concentrações inicial e final de etanol; t_0 e t e correspondem respectivamente aos tempos inicial e final de fermentação.

A fermentabilidade é outro fator importante na avaliação do processo fermentativo. Este parâmetro, de acordo com Briggs *et al.* (2004), indica a proporção de extrato do mosto que é fermentável conforme a Eq.4.

$$\text{Fermentabilidade (\%)} = \left(\frac{\text{extrato aparente inicial} - \text{extrato aparente final}}{\text{Extrato aparente inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Locais de desenvolvimento das análises

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fermentação de Bebidas, de Biotecnologia, de Análise Físico-Química e de Química de Alimentos da Universidade Estadual de Feira de Santana; no Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Cromatografia da Universidade Estadual da Bahia no campus de Senhor do Bonfim.

4.2. Materiais

4.2.1. Água

A água utilizada nos experimentos foi proveniente do mercado local da cidade de Feira de Santana- BA, em galões de 20L, encontrando-se a mesma com características físico-químicas adequadas para a produção do mosto cervejeiro.

4.2.2. Malte de cevada

O malte de cevada utilizado foi o malte claro do tipo *Pilsen* obtido de uma empresa de Porto Alegre-RS, em saco de 50Kg.

4.2.3. Lúpulo

Foram utilizados dois tipos de lúpulo: de amargor (extrato CO₂, 30% de α -ácidos) e o lúpulo aromático em pellets da marca *Hallertau Hersbrucker* (pellets, 40% de α -ácidos, origem alemã).

4.2.4. Melão de caroá (*Sicana odorífera*)

Os frutos utilizados neste trabalho foram obtidos de um único fornecedor na Feira Livre localizada no centro de abastecimento do município de Feira de Santana – BA, sendo que os frutos foram provenientes do município de Mutuípe-BA.

4.2.5. Microrganismo

O inóculo foi preparado a partir da utilização da levedura comercial liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* tipo *ale*, denominada de *Safale S-04*, originária da Bélgica e obtida de uma empresa de Porto Alegre-RS.

4.3. Obtenção da polpa de melão de caroá (adjunto) e do mosto puro malte

Inicialmente, as frutas foram selecionadas a partir da avaliação da coloração da casca, do tamanho, da textura e da integridade física. Os frutos foram lavados em água corrente, sanitizados em solução de hipoclorito de sódio a 50 ppm durante 10 minutos (Figura 4.1) e enxaguados em água corrente e abundante. Posteriormente, realizaram-se o descascamento e a fragmentação das frutas (Figura 4.2), sendo que ambas as atividades foram executadas com auxílio de uma faca. Em seguida, os mesmos foram inseridos na despulpadeira semi-industrial da marca Itametal (Figura 4.3) para realização da trituração e homogeneização, e por fim, as polpas foram acondicionadas em embalagens flexíveis de polietileno de baixa densidade e armazenadas em freezer a -18°C.

Figura 4.1- Sanitização dos melões.



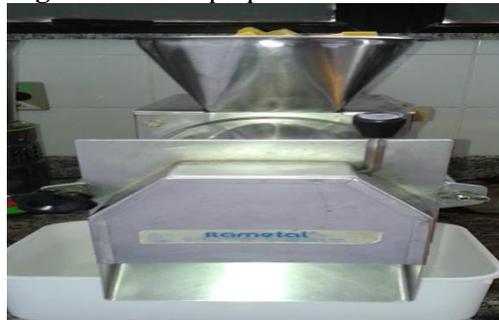
Fonte: Autor.

Figura 4.2 - Melões fragmentados.



Fonte: Autor.

Figura 4.3 - Despulpamento dos melões.



Fonte: Autor.

A obtenção do mosto puro malte, adequado para a produção de cervejas convencionais (12°P), foi executada de acordo com os itens 4.11.2 a 4.11.6, na planta piloto do Laboratório de Fermentação da Universidade Estadual de Feira de Santana- BA. O mosto obtido foi utilizado para a realização das análises físico-químicas e do processo fermentativo em escala laboratorial.

4.4. Obtenção dos mostos com adjunto (polpa de melão de caroá)

A partir da obtenção da polpa de melão de caroá sem tratamento prévio e do mosto puro malte conforme descrito no item 4.3, prepararam-se 200 mL de mostos constituídos de diferentes concentrações do adjunto e do mosto puro malte de acordo com a Tabela 4.1.

Sendo importante frisar que as porcentagens de adjunto utilizadas nas formulações foram baseadas no Decreto n°. 6.871 de 4 de junho de 2009.

Tabela 4.1- Porcentagem de mosto puro malte e adjunto (polpa de melão de caroá).

Ensaio	Mosto puro malte (%)	Adjunto (%)
1	100	0
2	90	10
3	70	30
4	50	50

Fonte: Autor.

4.5. Caracterização físico-química da polpa de melão de caroá (*Sicana odorífera*) e dos mostos com adjunto

Esta etapa consistiu em caracterizar a polpa de acordo como os seguintes parâmetros: pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, carboidratos totais, açúcares redutores, proteínas, lipídeos, umidade e minerais. Já os mostos foram avaliados quanto ao pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, carboidratos totais, açúcares redutores, proteínas, minerais, cor e amargor.

4.5.1. Determinação do pH

A leitura do pH das amostras foi realizada a partir do pHmetro digital (marca Instrutherm, modelo PH-1700).

4.5.2. Determinação dos sólidos solúveis totais

A leitura do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi realizada pelo método refratométrico, utilizando um aparelho digital (marca *Reichert*, modelo AR200) a 20°C.

4.5.3. Determinação de acidez total titulável

A acidez total titulável foi realizada a partir do método titulométrico com solução padronizada de NaOH 0,1N segundo IAL(2005).

4.5.4. Determinação de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram quantificados por espectrofotometria pelo método Fenol Sulfúrico a um comprimento de onda de 490 nm, segundo a metodologia de Dubois *et al.* (1956), utilizando o espectrofotômetro (SHIMADZU UV mini-1240) e uma curva padrão de glicose com concentração de 5 µg/mL de intervalo de 0 – 60 µg/mL.

4.5.5. Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram quantificados por método espectrofotométrico - DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico) com comprimento de onda de 540 nm segundo Miller (1959), utilizando o espectrofotômetro (SHIMADZU UV mini-1240). A curva padrão foi construída a partir da solução de glicose com concentração de 2mg/mL de intervalo de 0 – 2mg/mL.

4.5.6. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi dada pelo método de Kjeldahl (IAL, 2005).

4.5.7. Determinação de lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado a partir do método de Soxhlet conforme metodologia de IAL (2005).

4.5.8. Determinação de umidade

A umidade foi determinada através do método da estufa sob pressão reduzida a 70°C até peso constante de acordo com a metodologia de IAL (2005).

4.5.9. Determinação de minerais

Determinaram-se as concentrações dos seguintes minerais: sódio, potássio, magnésio, cálcio, lítio, níquel, fósforo, ferro, selênio, zinco, cádmio, cobalto, cobre, cromo, manganês, molibdênio, chumbo e vanádio, empregando o espectrômetro de emissão óptica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES), modelo Optima 5300 DV sequencial Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA), equipado com um amostrador automático AS 93-plus, um nebulizador ultrassônico U6000AT⁺ Cetac (Nebraska, EEUU) e um aparelho ICP-MS, modelo Perkin-Elmer SCIEX Elan 6100 DRCII equipado com um nebulizador e um amostrador automático Perkin-Elmer AS-91. De acordo a metodologia aplicada por Mir-Marqués *et al.*(2015).

Os comprimentos de ondas utilizados na determinação dos minerais, os limites de detecção das curvas analíticas, assim como os coeficientes angulares e lineares da regressão encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Comprimentos de onda, limites de detecção e quantificação e parâmetros da curva analítica para os elementos estudados.

Elementos	λ (nm)	Limite de detecção (mg kg ⁻¹) ^a	Limite de quantificação (mg kg ⁻¹) ^b	Coeficientes de Regressão ^c	
				Angular	Linear
Cádmio	228,802	0,00588	0,01959	4925,1	-72, 688
Cálcio	422,673	1,34815	4,49383	45863	344300
Chumbo	217,000	0,14772	0,49241	203,39	5,162
Cobalto	228,615	0,01299	0,04332	2912,8	17,039
Cobre	213,598	0,05146	0,17153	3355,7	52,957
Cromo	206,158	0,03065	0,10216	661, 67	-1,7498
Ferro	259,940	0,47251	1,57502	4791,9	882,18
Fósforo	213,618	0,0595	0,19835	484,25	-25,876
Lítio	610,365	0,00532	0,01773	34671	296,44
Magnésio	280,270	0,5002	1,66734	31343	110854
Manganês	259,372	0,0044	0,01466	31803	616,36
Molibdênio	202,032	0,09396	0,31320	2793,4	14,969
Potássio	769,897	0,70133	2,33776	13246	27822
Selênio	203,985	0,13493	0,44976	182,73	-6,4889
Sódio	330,298	3,4466	11,48221	23,003	73,546
Vanádio	292,401	0,00912	0,03039	7895,9	39,754
Zinco	206,200	0,02280	0,07600	1158,7	127,49

Fonte: Autor.

Nota: ^a Limite de detecção = 3 vezes o desvio padrão de 10 brancos dividido pelo coeficiente angular da curva; ^b limite de quantificação = 10 vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva ; ^c número de pontos da curva analítica igual a 10. Coeficiente de correlação para todos os elementos foi igual ou maior que 0,999.

4.5.10. Determinação de cor

A cor foi determinada pelo método espectrofotométrico com comprimento de onda de 430 nm segundo a metodologia da EBC (2005), utilizando o espectrofotômetro (SHIMADZU UV mini-1240).

4.5.11. Determinação de amargor

Determinou-se o amargor através do processo de extração de substâncias amargas com iso-octano e espectrofotometria com comprimento de onda de 275 nm segundo a EBC (2005), utilizando espectrofotômetro (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 220).

4.6. Análise estatística dos dados da caracterização físico-química da polpa e dos mostos com adjunto

Todas as análises da polpa de melão de caroá e dos mostos foram realizadas em triplicata, e todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Para as análises do mosto, foram realizadas ainda análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos das diferentes formulações, usando o programa SISVAR (5.0). Diferenças entre as médias no nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

4.7. Processo fermentativo dos mostos com adjunto em escala laboratorial

É importante destacar que para realizar o processo fermentativo dos mostos com distintas concentrações de adjuntos (Tabela 4.1), fez-se necessária outra elaboração dos mostos, uma vez que para esta etapa a polpa de melão de caroá (*Sicana odorífera*) teve que ser submetida a um tratamento prévio. No entanto, o mosto puro malte foi o mesmo utilizado no preparo dos mostos caracterizados físico-quimicamente, já que se encontrava dentro dos padrões requeridos para o processo fermentativo.

O processo fermentativo foi constituído das seguintes etapas: tratamento da polpa de melão de caroá, elaboração dos mostos com adjunto, preparo do inóculo, fermentação dos mostos com adjunto.

4.7.1. Tratamento da polpa de melão de caroá

O tratamento da polpa consistiu apenas na correção do pH e a utilização de metabissulfito de potássio. Para o ajuste do pH, utilizou-se ácido láctico, uma vez que segundo Silva *et al.*, (2009), o mosto final deve possuir pH em torno de 5 para um bom desempenho fermentativo. E de acordo com Carvalho *et al.* (1999), foi aprovada uma resolução que permite a utilização dos ácidos L(+) – láctico e DL- láctico na acidificação química do mosto. Briggs *et al.* (2004) detalham que a utilização de ácido láctico tem sido frequentemente realizada na Alemanha com o intuito de corrigir o pH do mosto.

O tratamento foi realizado da seguinte forma: em um béquer, adicionou-se um determinado volume de polpa e acrescentaram-se aos poucos alíquotas do ácido láctico, homogeneizando a solução com auxílio de um mixer (Figura 4.4), e controlando o pH através do pHmetro digital. Posteriormente, adicionou-se o metabissulfito na concentração de 100 mg/L e manteve a agitação. Conforme Dias, Schwan e Lima (2003), a adição de metabissulfito de potássio tem como função evitar a contaminação microbiana.

Figura 4.4 - Tratamento da Polpa



Fonte: Autor

4.7.2. Obtenção dos mostos com adjunto

Com a polpa tratada e o mosto puro malte, prepararam-se em triplicata quatro formulações dos mostos em frascos Erlenmeyers de 500 mL (Figura 4.5) de acordo com a Tabela 4.1. O volume da mistura correspondeu a 225 mL.

Figura 4.5 - Mostos com as diferentes concentrações de adjunto (0, 10, 30 e 50%) respectivamente da direita para a esquerda.



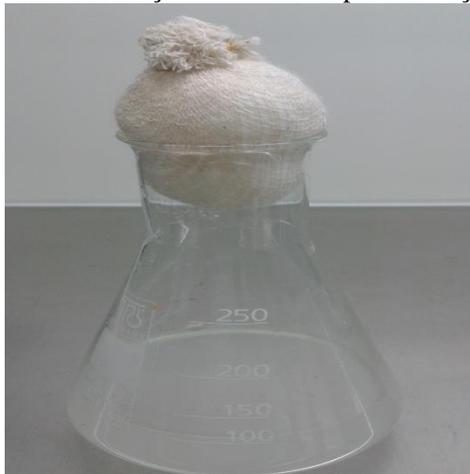
Fonte: Autor.

4.7.3. Padronização e propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Inicialmente, pesou-se 0,2g da levedura comercial liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* tipo *ale*, denominada de *Safale S-04*, baseando-se na quantidade descrita pelo fabricante. Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%), adicionou-se a massa de levedura (Figura 4.6). Em seguida, agitou-se a solução lentamente e realizou-se a contagem na câmara de Neubauer ($1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$) a fim de verificar se as células viáveis haviam alcançado a concentração de 10^7 cel/mL . Em caso negativo, pesar-se-ia mais uma quantidade da levedura, e novamente, seria realizada a contagem. Após ter obtido a concentração celular desejada, procedeu-se com a propagação, que consistiu na transferência de uma alíquota de 5 mL da solução salina com levedura para os frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 45 mL do mosto puro malte (Figura 4.7). Os frascos Erlenmeyers foram incubados em um shaker a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm durante 24h. Logo após, foi realizada a contagem para verificar se a concentração celular tinha atingido 10^8 cel/mL . Caso contrário, realizar-se-ia novamente a incubação por um determinado tempo até alcançar esta concentração.

É importante destacar que a propagação para cada mosto com as diferentes concentrações de adjunto foi realizada em triplicata.

Figura 4.6 – Solução utilizada na padronização.



Fonte: Autor.

Figura 4.7 – Solução utilizada na propagação.



Fonte: Autor.

4.7.4. Fermentação primária do mosto com o adjunto

Nos frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 225 mL de mosto com as diferentes concentrações de adjuntos (0, 10, 30 e 50%), cuja preparação encontra-se descrita no item 4.7.2, foi realizada a inoculação com a *Saccharomyces cerevisiae* através da transferência de 25 mL do inóculo, correspondente a 10% do volume total do meio fermentativo (250 mL). E em cada frasco Erlenmeyer, acoplou-se o sistema formado por rolha, válvula airlock, mangueira de silicone e um prendedor conforme a Figura 4.8 com intuito de evitar contaminação e microbiológica e trocas gasosas. Logo após, os frascos Erlenmeyers foram colocados em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 22°C até o teor de sólidos solúveis permanecer constante. Para a levedura do tipo *ale* esta estabilização ocorre de 2 a 5 dias.

Os testes fermentativos com as diferentes concentrações de adjuntos foram realizados em triplicata.

Figura 4.8 - Mostos com as diferentes concentrações de adjuntos (0, 10, 30 e 50%) respectivamente da direita para esquerda, inoculados com *Saccharomyces cerevisiae*, onde (1) rolha, (2) válvula airlock, (3) mangueira de silicone e (4) prendedor.



Fonte: Autor.

4.8. Acompanhamento analítico da fermentação primária em escala laboratorial

Durante o processo fermentativo, foram retiradas amostras periódicas de 12 em 12h para a realização das análises de concentração celular, viabilidade celular, teor de etanol, extrato aparente, ácidos orgânicos e glicerol.

É importante destacar que as amostras foram coletadas em eppendorfs de 10 mL e desgaseificadas a partir da agitação dos mesmos durante 1 minuto. Para a determinação da concentração das células em suspensão e da viabilidade celular, utilizou-se 1 mL da amostra desgaseificada, sendo este volume medido com auxílio de uma micropipeta (marca HTL, modelo LM-X). Logo, após, as amostras foram submetidas ao processo de centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos em centrífuga e o sobrenadante obtido foi utilizado para as demais análises supracitadas.

4.8.1. Concentração celular e viabilidade celular

A determinação da concentração celular (cel/mL) foi realizada em câmara de Neubauer (1/400 mm² x 1/10 mm) e para determinação das células viáveis e não viáveis, utilizou-se o Método Internacional de Coloração, utilizando azul de metileno segundo ASBC (1996). A viabilidade celular foi calculada a partir da Equação 5.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \right) \times 100 \quad \text{Eq.(5)}$$

4.8.2. Teor de etanol e extrato aparente

O teor de etanol (% v/v), extrato aparente (°P) foram determinados através do densímetro de bancada (marca Rudolph Research Analytical, modelo DDM 2911).

Para a transformação do teor de etanol (% v/v) para g/L utilizou-se a Equação 6:

$$\text{Etanol (g/L)} = \text{Etanol (\% v/v)} \times 0,789 \times \rho \quad \text{Eq. (6)}$$

Para a transformação do teor de extrato aparente de °P para concentração em g/L, utilizou-se a Equação 8:

$$Ext. ap. (g/L) = Ext. ap. (°P) \times \rho \times 10 \quad Eq. (7)$$

Onde: 0,789 g/mL é a densidade do etanol a 20 °C e ρ é a densidade do mosto (g/mL).

4.8.3. Concentração de ácidos orgânicos e glicerol

Os ácidos orgânicos e glicerol foram determinados em HPLC a partir da seguinte metodologia: após centrifugação, o sobrenadante foi congelado em microtubos de 2 mL e, posteriormente, foi realizada análise dos ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (HPLC Ultimate 300, Dionex, Alemanha) e colunas Rezex ROA (300 x 7,8 mm, EUA). Utilizou-se a fase móvel H₂SO₄ 0,005 M com fluxo de 0,6 mL/min e desgaseificada por 25 min em banho ultrassônico (Soniclean). A temperatura do forno foi regulada em 60 °C e o comprimento de onda da lâmpada UV, utilizada para quantificar os ácidos orgânicos, foi mantido em 210 nm. Diluíram-se as amostras no eluente e, em seguida, elas foram filtradas em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro 0,45 µm (Millipore) e acondicionadas em tubos de vidro (*vials*). Os *vials* foram transferidos para a bandeja do amostrador, cuja temperatura era 18°C. Os cromatogramas foram analisados utilizando o programa Chromeleon 6.8 (Dionex) e para cada composto foi construída uma curva de padrão com variadas concentrações.

4.9. Cálculo dos parâmetros fermentativos em escala laboratorial

Os parâmetros, produtividade volumétrica etanol (Q_p , g/L.h) e o rendimento em etanol ($Y_{p/s}$, g/g) foram calculados de acordo com Borzani (1986) e Moser (1988) de acordo com as equações 2 e 3 respectivamente.

$$Y_{p/s} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad Eq. (2)$$

$$Q_p = \frac{P-P_0}{t-t_0} \quad Eq. (3)$$

Onde:

S_o e S : Concentração aparente inicial e final respectivamente (g/L);

P_o e P : Concentração de etanol inicial e final respectivamente (g/L);

t_o e t : Tempo inicial e tempo final de fermentação (h).

O cálculo da fermentabilidade é dada pela Equação 4:

$$\text{Fermentabilidade (\%)} = \left(\frac{\text{extrato aparente inicial} - \text{extrato aparente final}}{\text{Extrato aparente inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

4.10. Análise estatística dos dados fermentativos

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Realizaram-se ainda análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias dos resultados fermentativos obtidos das diferentes formulações do mosto, usando o programa SISVAR (5.0). Diferenças entre as médias no nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

4.11. Produção da cerveja em escala piloto

A produção da cerveja com 50% de adjunto foi realizada na Planta Piloto (Figura 4.9) do Laboratório de Fermentação da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

Figura 4.9- Planta piloto do Laboratório de Fermentação da UEFS – BA.



Fonte: Autor.

4.11.1. Produção do mosto

4.11.1.1. Malteação

O processo de malteação não foi realizado em laboratório. Obteve-se o malte comercialmente.

4.11.1.2. Moagem

Para a produção de 60L de cerveja, realizou-se a moagem a seco de 8,8Kg do malte, utilizando um moinho manual. Durante o processo, buscou-se verificar a integridade das cascas e o tamanho das partículas do endosperma. As Figuras 4.10 e 4.11 mostram o malte antes e depois da moagem respectivamente.

Figura 4.10 - Grãos de malte inteiros.

Fonte: Autor.

Figura 4.11- Grãos de malte moídos.

Fonte: Autor.

4.11.1.3. Mosturação

Em um recipiente, adicionaram-se 43,8L de água mineral, verificando previamente o pH da mesma, que foi registrado como $\text{pH} = 4,6$, valor este que se aproximou do discriminado no rótulo da matéria-prima ($\text{pH} = 4,51$ a 25°C). Em seguida, adicionou-se o malte moído, e verificou o pH da mistura (água + malte), que correspondeu a 5,2. Logo, não foi necessário a correção do pH, tamponando assim a solução a partir da utilização do cloreto de cálcio (CaCl_2) na proporção de 1,26 g de CaCl_2 / Kg de malte. Após o controle do pH, a mistura foi submetida ao processo de aquecimento de acordo com a rampa de tempo e temperatura sob agitação branda (Figura 4.12). A rampa de mosturação utilizada está representada pela Figura 3.4. Na temperatura de 72°C (penúltima escala de temperatura), realizou-se o teste de sacarificação do amido através da adição de uma gota da solução de iodo 0,2N numa amostra do mosto, verificando através da ausência da coloração roxo-azulada que houve a hidrólise completa do amido. A Figura 4.13 corresponde à amostra do mosto depois da hidrólise total dessa macromolécula.

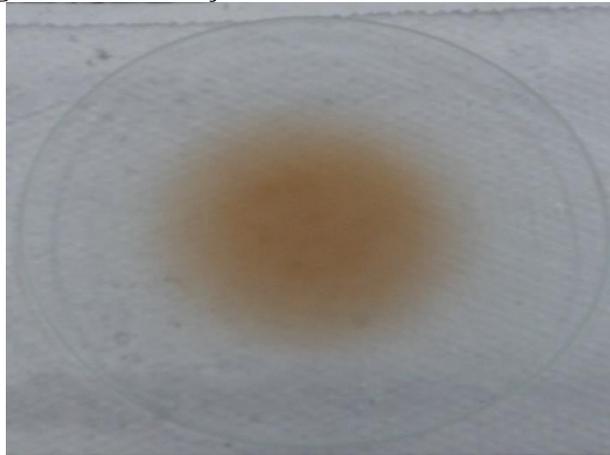
Figura 4.12 – Mistura submetida à mosturação.



Fonte: Autor.

Buscou-se fazer o controle do pH e do teor de sólidos solúveis no final da mosturação, registrando pH=5,2 e teor de sólidos solúveis igual a 13,5°brix.

Figura 4.13 – Reação do iodo na ausência do amido.



Fonte: Autor.

4.11.1.4. Filtração

Após a mosturação, o mosto foi transferido para um segundo recipiente de fundo falso (Figura 4.14), e adicionaram-se mais 11,8L de água, previamente aquecida até 75°C, no primeiro recipiente para lavagem do resíduo retido com o objetivo de extrair qualquer açúcar residual remanescente no bagaço. Posteriormente, iniciou-se o processo de filtração a partir da abertura da válvula do segundo recipiente com um fluxo que permitisse apenas a passagem da

parte líquida para um terceiro recipiente. O próprio bagaço do mosto serviu como camada filtrante. Realizou-se ainda a recirculação do mosto de modo a garantir a ausência de resíduos.

Foram verificados o pH e o teor de sólidos solúveis após o processo de filtração, registrando 5,2 e 11,8 °Brix respectivamente.

Figura 4.14 – Transferência do mosto.



Fonte: Autor.

4.11.1.5. Fervura do mosto

O mosto filtrado foi submetido à temperatura de 100°C durante 60 minutos. Nos primeiros quinze minutos da fervura, acrescentou-se o lúpulo em *pellets* na concentração de 0,82 g/L e nos quinze minutos antes do final da fervura, adicionou-se o lúpulo em extrato na concentração de 0,10g/L . A Figura 4.15 mostra o processo de fervura do mosto.

Figura 4.15 – Fervura do mosto.



Fonte : Autor.

4.11.1.6. Resfriamento

Após a fervura, a temperatura do mosto foi reduzida até em torno de 30°C através de um sistema de circulação de água resfriada por serpentina de metal. Concluído o processo de resfriamento, o mosto foi mantido em repouso e o *trub* formado foi removido. A Figura 4.16 mostra o mosto após o processo de resfriamento e o *trub* formado.

Figura 4.16 - Mosto depois do resfriamento.



Fonte: Autor.

4.11.2. Preparo do mosto com adjunto

Verificou-se o volume obtido após a fervura (45,3 L), e retiraram-se 50% deste volume para ser substituído pela polpa de melão de caroá previamente tratada conforme metodologia descrita no item 4.7.1. Posteriormente, o mosto misto foi aerado com auxílio de uma bomba de ar com filtro microbiano. O pH e o teor de sólidos solúveis foram determinados, e os valores obtidos foram pH = 5 e 12,1°brix respectivamente.

4.11.3. Fermentação primária

4.11.3.1. Padronização e propagação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A metodologia para a produção do inóculo encontra-se descrita no item 4.7.3. No entanto, pesou-se 2 g da levedura liofilizada em 500 mL da solução salina. Em 10 frascos Erlenmeyers de 1 L contendo 400 mL de mosto puro malte, transferiu-se 100 mL da solução salina com a levedura. O volume do inóculo requerido foi de aproximadamente 4,5 L, uma vez que corresponde aproximadamente a 10% do volume total (45,3 L).

4.11.3.2. Processo fermentativo

O mosto com adjunto resfriado até a temperatura de 22°C, foi transferido para o tanque de fermentação de aço inoxidável (Figura 4.17) com capacidade de 100L provido de controlador e indicador de temperatura e pressão e foi adicionado 4,5 L do inóculo. O tempo total da fermentação foi de 96h.

Figura 4.17- Tanque de Fermentação.



Fonte: Autor.

4.11.4. Maturação (fermentação secundária)

Essa etapa foi conduzida da seguinte forma: a temperatura do fermentador foi programada para 12°C e a cerveja ficou submetida a esta temperatura durante duas semanas. Alcançado este período, a mesma foi programada para 0°C e a bebida foi carbonatada de modo que a pressão interna do fermentador foi ajustada para 2kgf/cm². Sendo importante ressaltar que após esta etapa, a bebida já se encontrou bastante clarificada, não sendo necessário proceder com o processo de filtração.

4.12. Acompanhamento analítico da fermentação primária

Durante a fermentação primária, as amostras foram coletadas para a realização das seguintes análises: concentração celular, viabilidade celular, teor de etanol, glicerol, ácidos orgânicos, açúcares e extrato aparente. As amostras foram coletadas de 6 em 6 horas nas primeiras 24 horas e de 12 em 12 horas nas demais horas da fermentação.

As amostras foram coletadas em balões volumétricos de 100 mL e os procedimentos posteriores encontram-se descritos no item 4.8.

4.12.1. Concentração celular e viabilidade celular

Procedimento descrito no item 4.8.1.

4.12.2. Concentração de etanol, glicerol e ácidos orgânicos

A metodologia é a mesma descrita no item 4.8.3. No entanto, para a determinação do etanol, utilizou-se o detector de índice de refração (RI 101, Shodex, Japão).

4.12.3. Concentração de açúcares fermentáveis

As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi congelado em microtubos de 2 mL para posterior análise dos ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HPLC Ultimate 300, Dionex, Alemanha) e colunas HPX 87 C (Bio-Rad) (300 x 7,8 mm, EUA). A fase móvel utilizada foi água ultrapura com fluxo de 0,6 mL/min e degaseificada por 25 min em banho ultrassônico (Soniclean). A temperatura do forno foi mantida em 80°C e o RI (RI 101, Shodex, Japão) foi usado para a quantificação dos carboidratos. As amostras foram diluídas em água, sendo filtradas em membranas PVDF com poro de 0,45 µm (Millipore) em tubos de vidro (*vials*). Em seguida, os *vials* foram transferidos para a bandeja do amostrador, cuja temperatura era 18°C. Os cromatogramas foram analisados utilizando programa Chromeleon 6.8 (Dionex) e para cada composto (glicose, frutose, maltose e maltotriose) foi construída uma curva de padrão com variadas concentrações.

4.12.4. Concentração de extrato aparente

Metodologia descrita no item 4.8.2.

4.13. Parâmetros fermentativos

A produtividade em etanol (Q_p), o rendimento em etanol ($Y_{p/s}$), a eficiência e a fermentabilidade foram calculadas de acordo com as equações apresentadas no item 4.9.

4.14. Caracterização físico-química da cerveja com 50% de adjunto

A cerveja com 50% de adjunto foi caracterizada quanto aos seguintes parâmetros: pH, proteínas, cor, amargor, glicerol e ácidos orgânicos.

4.14.1. Determinação de pH

Metodologia descrita no item 4.5.1.

4.14.2. Determinação de proteínas

Metodologia descrita no item 4.5.6.

4.14.3. Determinação de cor

Metodologia descrita no item 4.5.10.

4.14.4. Determinação de amargor

Metodologia descrita no item 4.5.11.

4.14.5. Determinação de ácidos orgânicos

Metodologia descrita no item 4.8.3.

4.15. Análise Sensorial

A análise sensorial da cerveja elaborada foi realizada em cabines individuais com a utilização de luz branca, longe de ruídos e odores, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, contando com a presença de 70 provadores não selecionados e não treinados, de ambos os sexos e maiores de 18 anos.

O teste aplicado foi o teste de aceitação com escala hedônica estruturada com 9 pontos, solicitando ainda a avaliação de intenção de compra, utilizando uma escala estruturada de 5 pontos. A Figura 4.18 representa o modelo da ficha utilizada para a realização da análise sensorial.

Figura 4.18- Modelo de ficha de avaliação usado na análise sensorial.

	<p>Nome: _____ Data: _____</p> <p>Sexo: Feminino (<input type="checkbox"/>) Masculino (<input type="checkbox"/>) Idade: _____</p>
<p>Instruções: O (A) senhor (a) receberá uma amostra de cerveja.</p> <p>Por favor, avalie o produto de uma forma global, marcando um X no local da escala que indique o quanto gostou ou desgostou do produto.</p>	
<p>(<input type="checkbox"/>) Gostei extremamente.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Gostei muito.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Gostei moderadamente.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Gostei ligeiramente.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Indiferente.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Desgostei moderadamente.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Desgostei moderadamente.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Desgostei muito.</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Desgostei extremamente.</p>	
<p>Por favor, avalie o produto quanto a sua intenção de compra.</p>	
<p>(<input type="checkbox"/>) Certamente compraria</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Provavelmente compraria</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Talvez compraria</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Provavelmente não compraria</p> <p>(<input type="checkbox"/>) Certamente não compraria</p>	
<p>Comentários:</p>	

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química da polpa do melão de caroá e dos mostos com adjunto

5.1.1. Caracterização da polpa de melão de caroá (*Sicana odorífera*)

O melão de caroá (*Sicana odorífera*) é um fruto muito pouco conhecido, existindo conseqüentemente uma quantidade inexpressiva de dados na literatura relacionados ao mesmo, no que tange, por exemplo, a sua caracterização físico-química. Neste trabalho, que teve como objetivo a aplicação biotecnológica deste fruto, fez-se necessário conhecer suas características, até mesmo para posteriores correções, a fim de adequá-lo para o fim desejado. Os resultados das análises e os dados da literatura são apresentados na Tabela 5.1, com exceção daqueles referentes à determinação de minerais.

Tabela 5.1- Características físico-químicas da polpa de melão de caroá (*Sicana odorífera*) e dados da literatura.

Parâmetro	Presente estudo	Filho <i>et al.</i> (2015)
Umidade (%)	85,20 ± 0,35	82,46 ± 1,18
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	12,10 ± 0,06	4,15 ± 0,01
Açúcares redutores (%)	9,04 ± 0,07	-
Carboidratos totais (%)	10,54 ± 0,03	11,81 ± 1,29
pH	6,20 ± 0,02	6,61 ± 0,07
Acidez total titulável (% em ácido cítrico)	0,20 ± 0,07	0,33 ± 0,12
Proteína (%)	1,09 ± 0,13	2,62 ± 1,01
Lipídeos (%)	0,35 ± 0,05	1,00 ± 0,06

Notas: Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

O teor de umidade (85,2%) encontrado na polpa do melão de caroá diferiu pouco do valor encontrado por Filho *et al.*(2015), que correspondeu a 82,46% (Tabela 5.1) A determinação de umidade, segundo Ferreira e Pena (2003), refere-se ao valor obtido na determinação da água total contida no alimento, não indicando, porém a distribuição da mesma e a forma como é encontrada. De acordo com Oliveira, Afonso e Costa (2011), o alto

teor de umidade de frutas *in natura* juntamente com outros fatores tornam as mesmas suscetíveis à atuação de microrganismos deteriorantes.

A polpa do melão de caroá teve teor de sólidos solúveis igual a 12,1^oBrix (Tabela 5.1), apresentando-se adequado para o processo fermentativo da cerveja, visto que de acordo com Curi e Venturini Filho (2008) para a produção de cerveja comum, que é o objetivo deste trabalho, utilizam-se mostos com 12^oBrix (mostos convencionais). Então, não se fez necessário executar o processo de chaptalização da polpa, que segundo Dias, Schwan e Lima (2003), consiste em corrigir o teor de sólidos solúveis a partir do uso de uma solução de sacarose. Jaramillo *et al.* (2011) encontraram um valor de 13^oBrix, próximo ao encontrado neste trabalho. No entanto, o valor 4,15^oBrix encontrado por Filho *et al.* (2015) (Tabela 5.1) foi bastante inferior aos relatados. É importante destacar que segundo Oliveira, Afonso e Costa (2011), este parâmetro é utilizado como medida indireta do teor de açúcares, uma vez que à medida que o teor de açúcares aumenta ocorre simultaneamente uma elevação do teor de sólidos solúveis. Lima, Silva e Azevedo (2009) relataram que entre outros fatores, o teor de sólidos solúveis é indicativo da evolução da maturação das frutas.

Devido à aplicação da polpa de melão de caroá como adjunto do malte para produção de cerveja, então, é importante destacar que a determinação de açúcares é uma das análises mais importantes, uma vez que estes são substratos para as leveduras durante a fermentação, possibilitando, principalmente, a formação dos produtos (CO₂ e álcool). No que se refere aos açúcares redutores, a polpa apresentou 9,04% (Tabela 5.1) e o seguinte perfil: 42,8 g/L de glicose e 36,65 g/L de frutose. No entanto, não foram encontrados dados na literatura em relação a este parâmetro. De acordo com Chitarra e Chitarra (2005), os principais açúcares presentes em frutos são frutose, glicose e sacarose, os quais conferem doçura em proporções diferentes, ressaltando também que a porcentagem destes açúcares varia de acordo com a espécie. Quanto aos carboidratos totais, o melão de caroá teve 10,54%. Filho *et al.* (2015) encontraram um valor consideravelmente próximo (11,81%) (Tabela 5.1).

O pH da polpa de melão de caroá foi igual a 6,2 (Tabela 5.1), valor este similar ao encontrado por Jaramillo *et al.* (2011). Filho *et al.* (2015) verificaram pH correspondente a 6,61 (Tabela 5.1). Silva *et al.* (2011) avaliaram os parâmetros físico-químicos das seguintes variedades de melão: Amarelo-Ouro, Japonês e Pele-de-Sapo, os quais apresentaram respectivamente os seguintes valores de pH: 5,38; 6,49 e 6,17. Conforme Chitarra e Chitarra (2005), o pH é considerado como um importante fator antimicrobiano que promove estabilidade ao produto quanto ao que se refere ao desenvolvimento de microrganismos. No

entanto, de acordo com Monteiro *et al.* (2008), é desejável que este pH seja inferior a 4,5 para impedir a proliferação de microrganismos. De acordo com o pH da polpa do melão de caroá registrado neste trabalho, o fruto pode ser classificado como pouco ácido. Para a utilização da polpa de melão de caroá no processo fermentativo foi necessário corrigir este parâmetro com ácido láctico, uma vez que conforme Briggs *et al.* (2004), o pH favorável para o metabolismo da levedura é em torno de 5,0.

A acidez titulável em porcentagem de ácido cítrico na polpa de melão de caroá foi 0,20%. Filho *et al.* (2015) encontraram 0,33% em ácido cítrico (Tabela 5.1). Silva *et al.* (2011) apresentaram para o Amarelo-Ouro, Japonês e Pele-de-Sapo as respectivas acidez total em porcentagem de ácido cítrico: 0,093%; 0,045% e 0,086%. É importante destacar que acidez é resultante dos ácidos orgânicos, que por sua vez têm influência na cor, sabor, odor, assim como na qualidade das frutas (LIMA *et al.*, 2013).

O teor de proteínas verificado no melão de caroá foi 1,09%, valor inferior aquele encontrado por Filho *et al.* (2015) (Tabela 5.1), que correspondeu a 2,62% (Tabela 5.1). As proteínas, de acordo com Briggs *et al.* (2004) auxiliam a nutrição da levedura, favorecendo assim o processo fermentativo.

Em relação aos lipídeos, o valor encontrado foi 0,35%, inferior ao valor de 1% relatado por Filho *et al.* (2015) (Tabela 5.1). Conforme Azeredo (1999), estes compostos participam de muitas reações no metabolismo da levedura, por exemplo, contribuem na inibição da formação de ésteres de acetato durante o processo fermentativo.

De acordo com Somda *et al.* (2011), os minerais também desempenham papel importante no processo fermentativo, assim como afeta a estabilidade microbiológica. Na Tabela 5.2 são apresentadas as concentrações de dezessete minerais na polpa de melão de caroá e valores da literatura para comparação.

Tabela 5.2- Concentração de minerais na polpa do melão de caroá (*Sicana odorífera*) e dados da literatura.

Minerais	Presente trabalho	Filho <i>et al.</i> (2015)	Almeida <i>et al.</i> (2009) *
	Concentração (mg kg ⁻¹)		
Cádmio	ND	-	-
Cálcio	70,11 ± 0,31	15,0 ± 0,06	85,2 ± 1,09
Chumbo	ND	-	ND
Cobalto	ND	-	0,09 ± 0,40
Cobre	0,25 ± 0,13	6,9 ± 0,07	0,25 ± 0,01
Cromo	0,02 ± 0,11	ND	-
Ferro	2,42 ± 0,06	19,2 ± 0,44	2,5 ± 0,01
Fósforo	429,51 ± 0,12	12,5 ± 0,07	324,3 ± 1,46
Lítio	ND	-	-
Magnésio	81,69 ± 0,07	6,6 ± 0,05	107,7 ± 1,43
Manganês	ND	ND	ND
Molibdênio	ND	0,5 ± 0,06	-
Potássio	3316,38 ± 0,32	287,9 ± 0,70	3467,3 ± 0,18
Selênio	0,48 ± 0,22	ND	0,03
Sódio	20,96 ± 0,07	1,2 ± 0,01	19,8 ± 0,07
Vanádio	ND	-	-
Zinco	0,35 ± 0,07	10,4 ± 0,15	0,3 ± 0,00

ND: Não detectado

- : Não analisado

Notas: Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). *Os dados são referentes a outras frutas tropicais.

Neste trabalho, pode-se observar que o mineral de maior concentração na polpa de melão de caroá foi o potássio (3316,38 mgKg⁻¹), seguido por fósforo (429,51 mgKg⁻¹), magnésio (81,69 mgKg⁻¹), cálcio (70,11 mgKg⁻¹) e sódio (20,96 mgKg⁻¹) (Tabela 5.2). Hardisson *et al.* (2001) estudaram a composição mineral da banana e relataram que esta sequência ocorre em qualquer vegetal.

A polpa de melão de caroá (*Sicana odorífera*) não apresentou os seguintes minerais: cádmio, manganês, cobalto chumbo, lítio, molibdênio e vanádio (Tabela 5.2). Filho *et al.* (2015), analisaram entre os minerais citados apenas molibdênio e manganês, e observaram a ausência deste e 0,5 mgKg⁻¹ de molibdênio (Tabela 5.2). Almeida *et al.* (2009) relataram a ausência de manganês em algumas frutas tropicais, tais como sapoti, seriguela, mamão, mangaba e umbu. Em relação ao cobalto, ainda conforme Almeida *et al.* (2009), todas as frutas analisadas apresentaram este mineral, sendo que o mamão foi a fruta que apresentou menor concentração (0,09 mgkg⁻¹) (Tabela 5.2). Por outro lado, Leterme *et al.* (2006) citaram a ausência de cobalto em frutas, como mamão, abacaxi, cajá, graviola, etc. No que se refere ao chumbo, Almeida *et al.* (2009) não encontraram este mineral nas seguintes frutas: sapoti,

seriguela e umbu (Tabela 5.2). Em relação aos demais minerais (cádmio, lítio e vanádio), não foram encontrados dados na literatura.

Os valores de ferro, zinco e cobre apresentados na polpa de melão de caroá foram respectivamente, 2,42 mgkg⁻¹; 0,35 mgkg⁻¹ e 0,25 mgkg⁻¹ (Tabela 5.2) maiores que o limite de detecção (Tabela 4.2). As concentrações destes minerais encontradas por Filho *et al.*(2015) foram muito superiores (19,2 mgkg⁻¹; 10,4 mgkg⁻¹ e 6,9 mgkg⁻¹ , respectivamente) (Tabela 5.2). No entanto, valores próximos foram observados por Almeida *et al.* (2009) em outras frutas tropicais, como 2,5 mgkg⁻¹ de ferro e 0,3 mgkg⁻¹ de zinco no mamão e 0,25 mgkg⁻¹ de cobre no mamão (Tabela 5.2).

A polpa de melão de caroá apresentou as seguintes concentrações de cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio: 70,11 mgkg⁻¹; 429,51 mgkg⁻¹; 81,69 mgkg⁻¹; 3316,38 mgkg⁻¹ e 20,96 mgkg⁻¹ (Tabela 5.2), estes valores foram maiores do que o limite de detecção (Tabela 4.2). Filho *et al.* (2015) apresentaram valores inferiores (15,0 mgkg⁻¹; 12,5 mgkg⁻¹ , 6,6 mgkg⁻¹ , 287,9 mgkg⁻¹ e 1,2 mgkg⁻¹ , respectivamente) (Tabela 5.2). No estudo de Almeida *et al.* (2009), foram encontrados resultados próximos: 85,2 mgkg⁻¹ de cálcio na mangaba, 324,3 mgkg⁻¹ de fósforo na graviola, 107,7 mgkg⁻¹ de magnésio no umbu, 3467,8 mgkg⁻¹ de potássio no murici e 19,8 mgkg⁻¹ de sódio no mamão (Tabela 5.2).

Para os minerais cromo e selênio, a polpa de melão de caroá apresentou respectivamente as seguintes concentrações: 0,98 mgkg⁻¹ e 0,48 mgkg⁻¹ , sendo valores maiores que o limite de detecção (Tabela 4.2). Filho *et al.*(2015) relataram a ausência destes minerais. Almeida *et al.* (2009) avaliaram apenas o selênio, sendo que o tamarindo foi a fruta que apresentou maior concentração (0,03 mgkg⁻¹) (Tabela 5.2)

De acordo com Fennema (2000), a composição mineral dos vegetais é influenciada por fatores, tais como as diferenças genéticas, fertilidade do solo e o ambiente, no qual a planta se desenvolve. Esses fatores podem ter contribuído para as diferenças expressivas entre os valores encontrados na polpa de melão de caroá deste trabalho e da pesquisa desenvolvida por Filho *et al.* (2015), que também avaliaram os minerais no melão de caroá e relataram que não houve controle de fatores ambientais, podendo ocorrer assim alterações nas concentrações de nutrientes.

Segundo Briggs *et al.* (2004), alguns dos minerais essenciais para a fermentação, atuando seja como co-fatores para várias atividades enzimáticas, com função estrutural ,como componente necessário dos sistemas de transportes ou para o crescimento da levedura são cálcio, cobalto, cobre, ferro, potássio, molibdênio, manganês, magnésio e muitos destes

metais pesados são tóxicos quando encontrados em excesso. Além da ausência do cobalto, molibdênio e manganês, citados pelos autores, os seguintes metais pesados também não foram encontrados: cádmio, chumbo e vanádio, os quais, de acordo com Caballero, Pacheco e Sgarbieri (1997) são constituintes da levedura cervejeira. No entanto, não foram encontrados dados que confirmem a importância dos mesmos para a levedura e para o processo fermentativo. Althertum (2001) relata também a importância do zinco, sódio e fósforo, tendo a polpa de melão de caroá apresentado tais minerais. Apesar de a levedura cervejeira ser considerada como uma fonte excelente de selênio, cromo e lítio (CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997), não foram encontrados dados na literatura em relação à importância destes para levedura e/ou para o processo fermentativo. É importante destacar que a concentração dos metais pesados encontrados não ultrapassaram os limites máximos estabelecidos de tolerância para contaminantes inorgânicos em alimentos pela RESOLUÇÃO - RDC Nº. 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013.

Podendo-se que inferir que a polpa de melão de caroá possui grande parte dos minerais essenciais para as leveduras e para o processo fermentativo.

As funções específicas de cada mineral encontrados na polpa e nos mostos serão descritas no item 5.1.2.

5.1.2. Caracterização dos mostos com diferentes concentrações de adjunto

Os mostos com diferentes porcentagens de adjuntos (0%, 10%, 30% e 50% foram analisados físico-quimicamente e os resultados são expostos na Tabela 5.3, com exceção daqueles referentes à análise de minerais.

Tabela 5.3- Características físico-químicas dos mostos com adjunto.

Parâmetros	Concentração de adjunto no mosto			
	0%	10%	30%	50%
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	12,03 ^a ± 0,01	12,00 ^a ± 0,01	12,10 ^a ± 0,00	12,03 ^a ± 0,01
Carboidratos Totais (%)	12,65 ^d ± 0,01	12,30 ^c ± 0,02	12,11 ^b ± 0,04	11,46 ^a ± 0,00
Açúcares Redutores (%)	11,60 ^d ± 0,05	10,46 ^c ± 0,03	9,80 ^b ± 0,00	9,45 ^a ± 0,02
pH	5,30 ^a ± 0,07	5,63 ^{ab} ± 0,06	5,90 ^c ± 0,04	6,13 ^d ± 0,07
Acidez Total Titulável (%)	0,13 ^d ± 0,01	0,12 ^c ± 0,03	0,09 ^b ± 0,01	0,05 ^a ± 0,01
Proteínas (%)	1,34 ^d ± 0,03	1,29 ^c ± 0,00	1,18 ^b ± 0,01	1,12 ^a ± 0,02
Cor (EBC)	8,80 ^a ± 0,10	9,73 ^b ± 0,06	12,06 ^c ± 0,11	14,20 ^d ± 0,11
Amargor (BU)	17,30 ^d ± 0,15	16,30 ^c ± 0,18	11,90 ^b ± 0,13	9,80 ^a ± 0,15

Notas: Dados apresentados como médias ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com os dados dispostos na Tabela 5.3, não houve diferença significativa do teor de sólidos solúveis para as diferentes composições, uma vez que a polpa do melão de caroá e o mosto puro malte produzidos apresentaram aproximadamente 12°Brix. Sendo crucial frisar que de acordo com Brasil (2009), as cervejas fabricadas com mostos a 12 °Brix são classificadas como comuns pela legislação brasileira. Segundo Corazza (2001), o teor de sólidos solúveis indica um teor aproximado de açúcar, que ficou evidente neste trabalho quando se observou que mesmo que a polpa de melão de caroá tenha tido um teor de sólidos solúveis muito próximo ao do mosto puro malte, houve uma diferença significativa entre os mostos avaliados em relação aos carboidratos totais e açúcares redutores, ocorrendo uma redução da concentração de açúcares à medida que aumentou o teor de adjunto. Sendo importante destacar que a polpa de melão de caroá apresentou teor de carboidratos totais e açúcares redutores iguais a 10,54% e 9,04% respectivamente (Tabela 5.1).

O pH da polpa de melão de caroá correspondeu a 6,2, como registrado na (Tabela 5.1). Podendo-se observar que a adição gradativa da polpa de fruta acarretou o aumento do pH dos mostos, verificando-se uma diferença significativa entre os mostos. Conforme Kunze (2006), a faixa de pH ideal para um mosto é 5,3 – 5,5. Bamforth (2003) também relata uma faixa com valores próximos a do autor citado, que é compreendida entre 5,2 - 5,5. Na produção do

mosto puro malte, obteve-se um pH= 5,3, necessitando corrigir apenas o pH do adjunto de 6,2 para um valor que se enquadrasse na faixa ideal.

Em relação à acidez total titulável, notou-se também que houve uma diferença significativa entre os mostos. Este parâmetro tendeu a decrescer à medida que se aumentou a concentração do adjunto. A acidez do melão de caroá correspondeu a 0,10% (Tabela 5.1).

O teor proteico do mosto foi reduzido com o aumento da concentração da polpa de melão de caroá. Esta apresentou 1,09% de proteína bruta (Tabela 5.1). Conforme Briggs *et al.* (2004), os adjuntos atuam como diluentes do teor de nitrogênio solúvel no mosto. Meilgaard (2002) aborda que os adjuntos geralmente conferem ao mosto pouco ou até mesmo nenhum nitrogênio, resultando na redução de substâncias nutritivas do meio fermentativo. O autor ainda relata que os mostos cervejeiros de 11 a 12 °P, normalmente, tem um valor médio de proteínas de 0,43% e compreendido na faixa de 0,30 – 0,60%. Os valores obtidos neste trabalho para os diferentes mostos foram superiores, denotando que a aplicação do adjunto beneficiou o processo fermentativo, uma vez que não reduziu o teor de proteína a um nível inferior ao relatado. Cereda e Venturini Filho (1998) analisaram entre outros parâmetros químicos, o teor de proteínas de dois tipos de mostos com os seguintes adjuntos: hidrolisado de milho e de mandioca. A porcentagem de malte foi 67% e 33% de hidrolisado. Estes mostos apresentaram respectivamente teores proteicos correspondentes a 0,40% e 0,42%.

A cor foi intensificada com o aumento da concentração de adjunto, existindo ainda uma diferença significativa entre os mostos. Este parâmetro, segundo Shellhameer (2009), é determinado pelo tipo de grãos e mais especificamente pelo tipo de processo aos quais eles são submetidos. Conforme Eblinger e Narzib (2012), em relação a estes processos, podem-se destacar a secagem, mosturação e a fervura. Nesta etapa, vários aminoácidos reagem com açúcares (Reação de Maillard), formando produtos intermediários que sofrem transformações resultando em melanoidinas. Além destas, os polifenóis também contribuem com a formação da coloração através da oxidação não enzimática e da polimerização. Carvalho *et al.* (2009) também observaram que a cor do mosto produzido com suco da banana, apresentou-se um pouco mais escuro do que aquele produzido com puro malte, inferindo que este fato pode ter sido devido às enzimas presentes nos frutos, como a polifenoloxidase, que tenham contribuído para o aparecimento de uma coloração mais escura resultante do escurecimento enzimático. Sendo este fato indicativo da necessidade de um tratamento para inativação enzimática.

Observou-se que a adição do adjunto influenciou a intensidade de amargor através da redução deste parâmetro. De acordo com Silva e Faria (2008), os principais compostos responsáveis pelo amargor são os iso- α -ácidos. Este fato era esperado, uma vez que o aumento da concentração da polpa reduziu diretamente a quantidade de compostos responsáveis pelo amargor, uma vez que a quantidade de lúpulo utilizada foi a mesma em todas as formulações.

Em relação aos minerais no mosto, os resultados estão registrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4- Concentração de minerais no mosto.

Minerais	Concentração (mg kg ⁻¹)			
	Concentração de adjunto no mosto			
	0%	10%	30%	50%
Cádmio	ND	ND	ND	ND
Cálcio	98,00 ^d ± 0,35	92,65 ^c ± 0,31	80,18 ^b ± 0,23	73,87 ^a ± 0,21
Chumbo	ND	ND	ND	ND
Cobalto	ND	ND	ND	ND
Cobre	0,08 ^a ± 0,01	0,11 ^b ± 0,05	0,13 ^c ± 0,03	0,18 ^d ± 0,01
Cromo	0,021 ^a ± 0,05	0,023 ^b ± 0,02	0,028 ^c ± 0,10	0,032 ^d ± 0,07
Ferro	0,32 ^a ± 0,04	0,52 ^b ± 0,01	0,85 ^c ± 0,02	1,04 ^d ± 0,01
Fósforo	486,48 ^d ± 0,11	481,37 ^c ± 0,09	463,18 ^b ± 0,07	454,33 ^a ± 0,05
Lítio	ND	ND	ND	ND
Magnésio	54,95 ^a ± 0,06	57,95 ^b ± 0,03	62,2 ^c ± 0,08	70,06 ^d ± 0,04
Manganês	ND	ND	ND	ND
Molibdênio	ND	ND	ND	ND
Potássio	625,09 ^a ± 0,31	894,56 ^b ± 0,42	1523,91 ^c ± 0,35	2044,73 ^d ± 0,37
Selênio	1,71 ^d ± 0,07	1,43 ^c ± 0,11	0,76 ^b ± 0,09	0,54 ^a ± 0,13
Sódio	65,5 ^d ± 0,21	60,25 ^c ± 0,20	49,29 ^b ± 0,10	31,13 ^a ± 0,15
Vanádio	ND	ND	ND	ND
Zinco	0,11 ^a ± 0,05	0,13 ^b ± 0,01	0,18 ^c ± 0,01	0,22 ^d ± 0,03

ND: Não detectado.

Notas: Dados apresentados como médias ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Verificou-se que assim como a polpa de melão de caroá, os mostos não apresentaram os seguintes minerais: cádmio, chumbo, cobalto, lítio, manganês, molibdênio e vanádio. Destes minerais, Briggs *et al.* (2004) destacaram como essenciais para fermentação o cobalto, manganês e molibdênio.

Em relação, aos demais minerais, observou-se que houve uma diferença significativa entre todos os mostos.

O mosto puro malte apresentou maior concentração de cálcio (98 mgKg^{-1}), sendo que houve redução deste mineral nos mostos à medida que se aumentou a concentração de adjunto (Tabela 5.4). Amorim (2005) relata que a concentração deste mineral no mosto varia de 150 - 2000 mgKg^{-1} . Todos os mostos apresentaram concentração inferior aos valores apresentados pelo autor. É importante destacar que de acordo com Tenge (2009), o principal papel do cálcio na produção da cerveja está ligado ao mecanismo de floculação da levedura.

A concentração de cobre nos mostos foi diretamente proporcional à concentração de adjunto. A polpa de melão de caroá apresentou $0,25 \text{ mgKg}^{-1}$ (Tabela 5.2) e o mosto puro malte ($0,08 \text{ mgKg}^{-1}$) (Tabela 5.4). De acordo com Amorim (2005), a concentração do cobre em mostos varia de 0,2 a 8 mgKg^{-1} . Todos os mostos apresentaram valores ligeiramente inferiores, porém a polpa contribui para o aumento da concentração deste mineral, sendo que a amostra com 50% de adjunto apresentou valor mais próximo ($0,18 \text{ mgKg}^{-1}$). Segundo Tenge (2009), o cobre é requerido como cofator enzimático para o metabolismo da levedura.

Houve um aumento da concentração de cromo nos mostos à medida que aumentou a concentração de adjunto, porém não existem dados na literatura referentes à sua concentração nos mostos e nem a importância dos mesmos para a levedura e o processo fermentativo.

Ocorreu um incremento na concentração de ferro nos mostos a partir do aumento da porcentagem de adjunto utilizado (Tabela 5.4). A concentração deste mineral no mosto puro malte correspondeu a $0,32 \text{ mgKg}^{-1}$, valor inferior ao encontrado ($0,13 \text{ mgKg}^{-1}$) por Rudin (1974). Conforme Tenge (2009), assim como o cobre, o ferro é requerido como cofator enzimático para o metabolismo da levedura.

A concentração do fósforo nos mostos reduziu ligeiramente com o aumento da concentração de adjunto (Tabela 5.4). Conforme Amorim (2005), a concentração normalmente encontrada em mostos corresponde a uma variação de 20 – 200 mgKg^{-1} . No entanto, todos os mostos apresentaram valores superiores (Tabela 5.4). Sendo importante destacar que de acordo com Boulton e Quain (2001), os fosfatos são nutrientes essenciais para o crescimento da levedura.

A concentração de magnésio aumentou à medida que a porcentagem de adjunto utilizada foi incrementada (Tabela 5.4). De acordo com Amorim (2005), os mostos apresentam concentração deste mineral na faixa de 80 a 3900 mgKg^{-1} . Os valores obtidos foram inferiores, porém a polpa de melão de caroá contribui para este aumento, tanto que o

mosto com 50% de adjunto apresentou concentração mais próxima ($70,06 \text{ mgKg}^{-1}$) (Tabela 5.4). O magnésio, de acordo com Boulton e Quain (2001), é um importante cofator para muitas enzimas durante a fermentação.

O potássio, mineral mais encontrado no melão de caroá, teve sua concentração aumentada nos mostos com maiores concentrações de polpa. Segundo Amorim (2005), a variação da concentração deste mineral no mosto encontra-se entre 300 a 1200 mgKg^{-1} . Apenas os mostos com 30% e 50% de polpa apresentaram concentrações superiores, que corresponderam respectivamente a $1523,91 \text{ mgKg}^{-1}$ e $2044,73 \text{ mgKg}^{-1}$ (Tabela 5.4). Conforme Tenge (2009), o potássio é o principal eletrólito para regulação osmótica e atua como cofator para as enzimas envolvidas em fosforilação oxidativa e metabolismo de carboidratos.

A concentração de selênio reduziu com o aumento da concentração do adjunto. Não foram encontrados dados na literatura e nem a importância do mesmo para a levedura e a fermentação.

O mosto puro malte apresentou maior concentração de sódio ($65,5 \text{ mgKg}^{-1}$) (Tabela 5.4), logo o aumento da porcentagem de adjunto reduziu a concentração deste mineral nos mostos. Segundo Rudin (1974), o mosto puro malte apresenta 112 mg/L . Conforme Kunze (1999), o sódio tem participação no metabolismo das células de levedura, assim como na manutenção do transporte de potássio.

A polpa de melão de caroá contribuiu para o aumento da concentração de zinco nos mostos. De acordo com Tenge (2009) o limite crítico para a fisiologia da levedura é abaixo de $0,12 \text{ mg/L}$. Todos os mostos apresentaram concentrações próximas do valor relatado. Ainda, conforme Tenge (2009), o zinco desempenha papel importante no metabolismo fermentativo da levedura, uma vez que ele é essencial para a atividade da enzima álcool desidrogenase e também estimula a ingestão de maltose e maltotriose.

5.2. Acompanhamento analítico da fermentação em escala laboratorial

Para análise dos dados, foram plotados os seguintes gráficos: concentração celular e viabilidade celular, consumo de substrato e produção de etanol, assim como foram apresentados os dados relacionados à concentração de glicerol e de ácidos orgânicos. Sendo

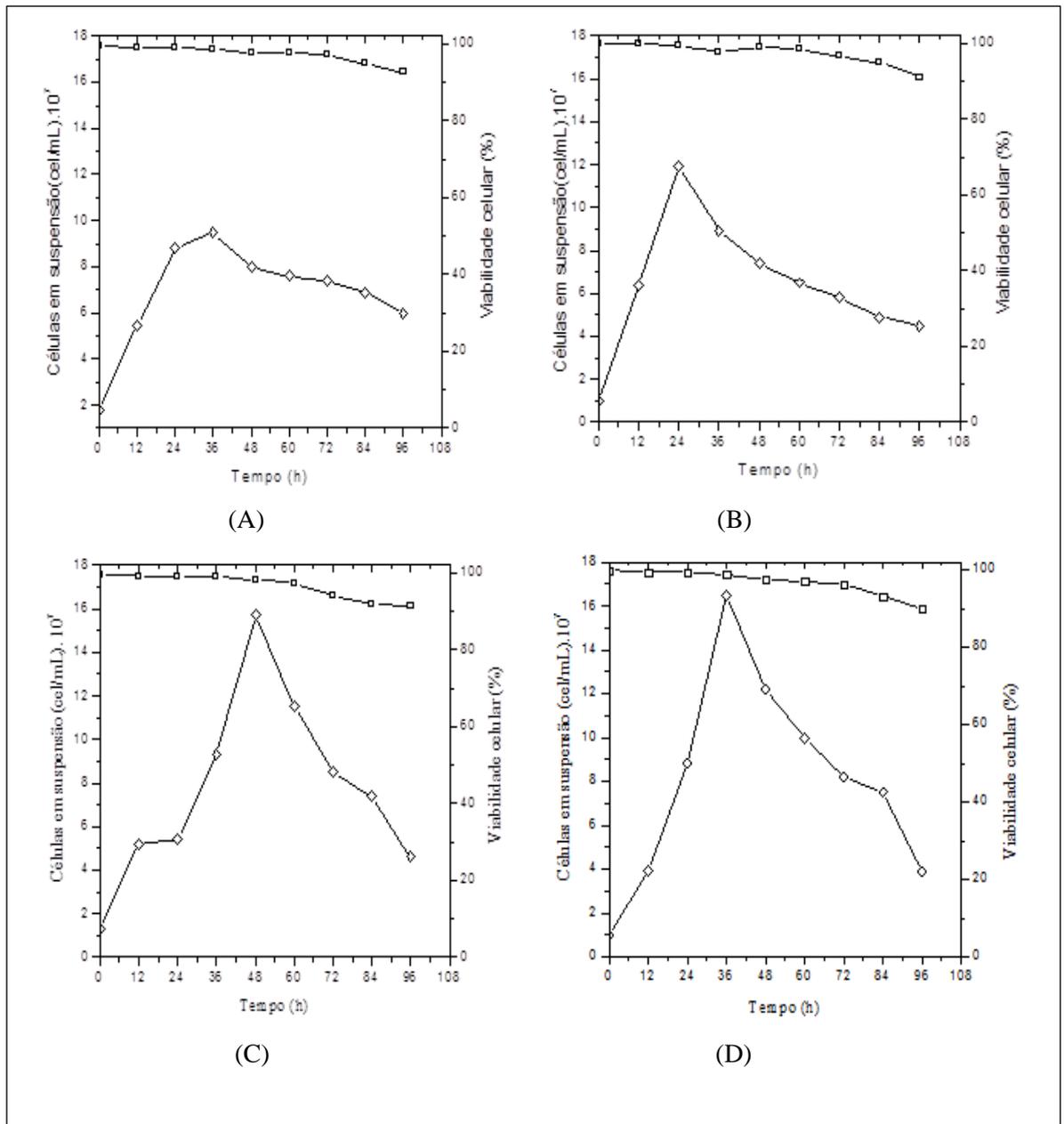
que todas estas variáveis encontram-se função do tempo. Apresentou-se o tratamento estatístico, assim como parâmetros fermentativos (Q_p , $Y_{p/s}$ e fermentabilidade aparente).

5.2.1. Concentração celular (células em suspensão) e viabilidade celular

Através da representação gráfica da concentração celular (células em suspensão) e viabilidade celular em função do tempo de fermentação apresentada na Figura 5.1, observou-se que a fase *lag* ou de latência, que é a etapa de adaptação não ocorreu em nenhum dos mostos. Isso pode ser explicado devido ao processo de propagação da levedura ter ocorrido no meio com alguns nutrientes já existentes no meio fermentativo, conseqüentemente, as leveduras já se encontravam adaptadas. Outro fator pode ter sido a rápida adaptação da levedura ao meio fermentativo. Muller *et al.* (2007) trabalharam com outra espécie de levedura (*Saccharomyces boulardii*) e também não observaram esta fase no trabalho devido ao meio de cultivo ser o mesmo utilizado no preparo do pré-inóculo.

A fase logarítmica ou exponencial, em que o crescimento celular é bastante expressivo, e conseqüentemente, ocorre maior consumo do substrato e formação do produto (etanol), o valor máximo da concentração de células em suspensão foi atingido entre as 24h e 48h, sendo que no mosto com maior concentração de adjunto (50%), este valor correspondeu a $1,65 \times 10^8$ cel/mL nas 36h, seguido por $1,57 \times 10^8$ cel/mL nas 48h no mosto com 30% de adjunto; $1,19 \times 10^8$ cel/mL nas 24 h no mosto com 10% de adjunto e $0,96 \times 10^8$ cel/mL nas 36h no mosto com 0% de adjunto (Figura 5.1). Podendo-se inferir que o adjunto favoreceu o crescimento das leveduras. Briggs *et al.* (2004) relataram que o aumento da concentração de adjunto pode reduzir o teor de nitrogênio solúvel e o nitrogênio amino livre, assim como algumas substâncias inorgânicas a um nível que o crescimento da levedura possa ser prejudicado. Com o acompanhamento do crescimento celular, não foi observado este problema. Podendo-se entender que mesmo com uma quantidade expressiva de adjuntos, os componentes necessários para o crescimento celular não foram reduzidos a níveis que prejudicassem o desenvolvimento das leveduras. Na análise dos resultados da Tabela 5.4, observou-se que o adjunto contribuiu com alguns minerais que são essenciais para o crescimento das leveduras, podendo ser um indicativo que o incremento destes no mosto com adjunto contribui para o processo fermentativo. Pavlak *et al.* (2011) ressaltaram que o conteúdo mineral do mosto é um dos fatores que pode influenciar a viabilidade celular.

Figura 5.1 - Perfis de concentração de células em suspensão (cel/mL) (\diamond) e de viabilidade celular (%) (\square) nos seguintes mostos: (A) com 0% de adjunto; (B) com 10% de adjunto; (C) com 30 % de adjunto e (D) com 50 % de adjunto.



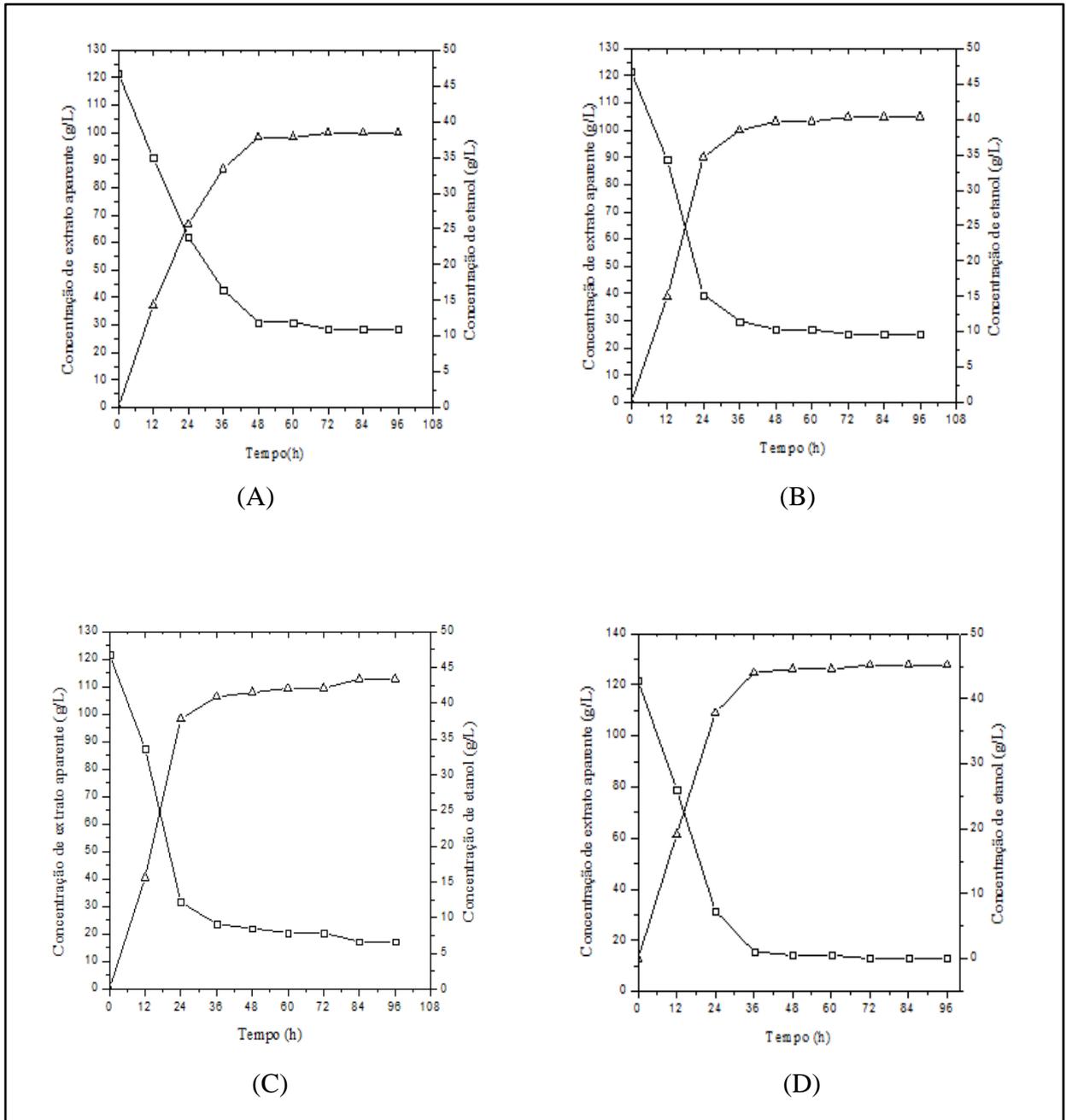
Após o crescimento máximo das leveduras, iniciou-se imediatamente o processo de declínio ou lise celular, que de acordo com Boulton e Quain (2001), deve-se à depleção dos nutrientes ou até mesmo aos efeitos tóxicos do etanol.

Os valores de viabilidade foram elevados ao longo de toda a fermentação. Nas primeiras 48h de fermentação dos mostos com 0, 10, 30 e 50%, estes valores encontravam-se respectivamente nas seguintes faixas: 99,4 - 97,5%; 97,9 - 100%; 98,1 - 99,6% e 97,5 - 100% (Figura 5.1). Sendo que no final da fermentação (96h), as porcentagens de células viáveis foram respectivamente: 92,7%; 91,1%; 91,3% e 90%. Tal decréscimo pode ser explicado devido à toxicidade do etanol, que é um dos principais fatores que causam instabilidade no processo fermentativo (MOREIRA *et al.*, 2013), e também a redução de substrato disponível (CARVALHO e ZAMBIAZI; 2011). Eblinger e Narzib (2012) relataram que as leveduras podem desenvolver um padrão ideal (viabilidade > 95%). Isso depende conforme Guido *et al.* (2004), do estado fisiológico que se refere não apenas a multiplicação, mas à sua atividade metabólica.

5.2.2. Consumo de substrato e produção de etanol

De acordo com a Figura 5.2, pode-se observar que a maior concentração de etanol foi obtida no mosto com 50% de adjunto (45,21 g/L), que corresponde a um teor alcoólico de 5,7% , seguido pela produção de 43,4 g/L (5,5%) no mosto com 30% de adjunto; 40,2 g/L (5,11%) no mosto com 10% e 38,42 g/L (4,8%) no mosto com 0% de adjunto. Notando-se então, que o adjunto favoreceu o aumento da produção de etanol.

Figura 5.2 - Perfis da concentração de etanol (g/L) (Δ) e de concentração de extrato aparente (g/L) (\square) nos seguintes mostos: (A) com 0% de adjunto; (B) com 10% de adjunto; (C) com 30 % de adjunto e (D) com 50 % de adjunto



O aumento da produção de etanol nos mostos com adjunto pode ter sido decorrente da concentração de minerais importantes para o processo fermentativo, assim como devido ao perfil de açúcares da polpa de melão de caroá (glicose e frutose). Sendo os mesmos açúcares simples e fermentescíveis. Conforme Briggs *et al.* (2004), o mosto puro malte possuem além

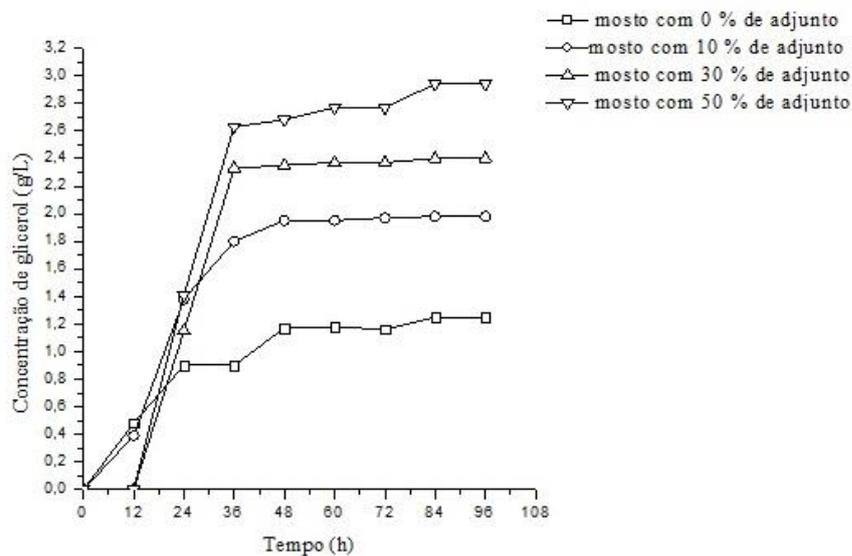
da maltose, maltotriose, sacarose, glicose, que são fermentescíveis, as dextrinas, que não são metabolizados pela *Saccharomyces cerevisiae*. Boulton e Quain (2001) abordam que a fração não fermentável de extrato corresponde a aproximadamente 25% do total de carboidratos do mosto.

O mosto com 0% de adjunto apresentou teor alcoólico na faixa de 4 a 5%, no entanto, os mostos com adjunto apresentaram valores superiores devido à mudança do perfil de açúcares resultante da adição do adjunto. Segundo Vidgren (2010), mostos com gravidade original de 11 a 12°P resultam em cerveja de teor alcoólico de 4 a 5 %.

5.2.3. Concentração de glicerol e ácidos orgânicos durante a fermentação

De acordo com a Figura 5.3, que apresenta a concentração do glicerol durante o processo fermentativo dos mostos, houve um aumento da concentração deste composto durante todo processo fermentativo, no entanto, o mosto com 50 % de adjunto apresentou maior concentração (2,94 g/L) e no mosto com 0% de adjunto, a concentração foi a menor (1,25g/L). Carvalho (2009) também avaliou o comportamento deste componente na fermentação do mosto que utilizou a banana como adjunto, verificando um aumento do glicerol durante toda fermentação. De acordo com Lima, Basso e Amorim (2001), dos açúcares metabolizados pela levedura, estima-se que 5% são desviados para gerar produtos secundários na fermentação, tais como os ácidos orgânicos, glicerol, álcoois superiores, acetaldeído, entre outros. Eblinger (2009) ressalta que o glicerol é um álcool multivalente formado durante a glicólise; sua concentração depende da quantidade de açúcares fermentescíveis totais e é proporcional à gravidade do mosto.

Figura 5.3- Perfil da concentração de glicerol durante a fermentação primária dos mostos com as seguintes concentrações de adjuntos: 0, 10, 30 e 50%



Klopper *et al.* (1986), relataram que cervejas *ale* apresentaram teor de glicerol um pouco mais alto que cervejas *pilsen*, de 1,5 a 2,9 g/L. Os valores encontrados após a fermentação primária foram próximos aos relatados nesta faixa. Podendo-se verificar ainda que o teor de glicerol foi proporcional ao teor do adjunto. Este fato pode ser explicado de acordo com Nevoigt e Stahl (1998) que destacam que a produção de glicerol é maior em meio rico em glicose. Zhao e Lin (2003) avaliaram o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em meio com alta concentração de glicose, relatando que a concentração de glicerol aumentou em função do aumento da concentração daquele açúcar, porém estudos recentes tem buscado investigar este acontecimento.

A Tabela 5.5 apresenta a concentração de ácidos orgânicos (acético, cítrico, láctico, fórmico e succínico) no final da fermentação primária. Podendo-se observar que concentração de ácido acético foi maior no mosto fermentado com 10% de adjunto (0,65 g/L), sendo que não houve diferença significativa entre os mostos com 0 e 30% de adjunto, que apresentaram respectivamente 0,57g/L e 0,56 g/L e o mosto fermentado com 50% apresentou 0,42 g/L (Tabela 5.5). Klopper *et al.* (1986) determinaram a concentração deste ácido no final da fermentação primária de cerveja *Pilsen*, obtendo-se 0,02 – 0,041 g/L. Todas as amostras apresentaram valores fora desta faixa.

Tabela 5.5- Perfil da concentração de ácidos orgânicos (g/L) no tempo final da fermentação primária dos mostos com as seguintes concentrações de adjuntos: 0, 10, 30 e 50%.

Ácidos orgânicos (g/L)	Concentração de adjunto			
	0%	10%	30%	50%
Acético	0,57 ^{a2} ± 0,01	0,65 ^{a3} ± 0,00	0,56 ^{a2} ± 0,01	0,42 ^{a1} ± 0,00
Cítrico	0,34 ^{a1} ± 0,01	0,87 ^{a2} ± 0,02	1,93 ^{a3} ± 0,01	3,07 ^{a4} ± 0,01
Lático	0,00 ^{a1} ± 0,00	0,81 ^{a2} ± 0,01	2,01 ^{a3} ± 0,01	2,32 ^{a4} ± 0,02
Fórmico	0,60 ^{a1} ± 0,00	0,91 ^{a2} ± 0,00	1,11 ^{a3} ± 0,01	1,63 ^{a4} ± 0,01
Succínico	2,03 ^{a1} ± 0,01	2,09 ^{a2} ± 0,00	2,22 ^{a3} ± 0,02	3,31 ^{a4} ± 0,01

Notas: Dados apresentados como médias ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa entre os mostos fermentados no que se refere à concentração de ácido cítrico, podendo-se observar que a polpa de melão de caroá contribuiu para o aumento da concentração deste ácido nos mostos com 0, 10, 30 e 50%, os quais apresentaram respectivamente 0,34 g/L; 0,87 g/L; 1,93 g/L e 3,07 g/L. Klopper *et al.* (1986) encontraram 0,15 a 0,23 g/L de ácido cítrico. Apenas o mosto puro malte obteve resultado próximo ao encontrado pelos autores.

Em relação à concentração de ácido lático, houve diferença significativa entre os mostos fermentados com 0, 10, 30 e 50%, que apresentaram 0,0 g/L; 0,81 g/L; 2,01 g/L e 2,32 g/L, respectivamente. Podendo-se inferir que com exceção do mosto puro malte, os demais apresentaram este ácido devido à correção do pH da polpa de melão de caroá, realizada com auxílio do ácido lático. Klopper *et al.* (1986) encontraram 0,015 a 0,047 g/L, valores inferiores aos encontrados neste trabalho. Maiorella *et al.* (1984) observaram que a concentração inibitória para a *Saccharomyces cerevisiae* varia de 10 a 40 g/L, logo a concentração de adição de ácido lático na polpa de melão não prejudicou o processo fermentativo.

Houve diferença significativa entre todos os mostos fermentados em relação à concentração dos ácidos fórmico e succínico (Tabela 5.5). No entanto, não foram encontrados dados na literatura relacionados a estes ácidos. No entanto, observou-se que o aumento da concentração de adjunto implicou no aumento da concentração de tais ácidos.

Conforme Willaert (2007), os ácidos orgânicos são compostos excretados pelas células de levedura, sintetizados através da biossíntese de aminoácidos e do metabolismo de

carboidratos, assim como sua formação está associada ao ciclo incompleto do ácido cítrico (Ciclo de Krebs). A produção destes ácidos é influenciada pela cepa da levedura e a velocidade da fermentação, uma vez que fermentação mais lenta implica em níveis mais baixos de excreção. De acordo com Briggs *et al.* (2004), alguns ácidos orgânicos podem ser reassimilados durante o processo fermentativo.

5.3. Parâmetros fermentativos em escala laboratorial

Na Tabela 5.6, encontram-se os resultados referentes aos parâmetros fermentativos (fermentabilidade aparente, produtividade volumétrica, fator de conversão de substrato em etanol).

Tabela 5.6 - Parâmetros fermentativos do final da fermentação de mostos com diferentes concentrações de adjunto.

Parâmetros fermentativos	Concentração de adjuntos			
	0%	10%	30%	50%
Fermentabilidade aparente (%)	76,63 ± 0,05	79,32 ± 0,05	85,84 ± 0,06	89,42 ± 0,10
Qp (g/L.h)	0,40 ± 0,01	0,42 ± 0,11	0,45 ± 0,07	0,47 ± 0,02
Yp/s (g/g)	0,41 ± 0,06	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,00	0,42 ± 0,01

A fermentabilidade aparente do mosto sofreu uma influência expressiva com adição de adjunto, uma vez que com o aumento da concentração da polpa de melão de caroá, notou-se também o aumento desta variável. Neste trabalho, o mosto com 50% de adjunto apresentou fermentabilidade igual a 89,42%. Seguido por 85,84% do mosto com 30% de adjunto; 79,32% do mosto com 10% de adjunto e o mosto com 0% de adjunto apresentou 76,63%. De acordo com Briggs *et al.* (2004), os valores comuns de fermentabilidade para mosto puro malte encontram-se na faixa de 64 a 77%. Este por possuir maior teor de dextrina, que é um açúcar não fermentado pela *Saccharomyces cerevisiae*, apresentou menor fermentabilidade. Cereda e Venturini Filho (1998), que compararam como adjuntos do malte os hidrolisados de milho, de mandioca e o xarope de maltose comercial, relataram que o mosto contendo xarope de maltose apresentou menor fermentabilidade. No mosto com hidrolisado de milho, a

fermentabilidade foi de 78,40%, no mosto com hidrolisado de mandioca, esta correspondeu a 80,67 e o mosto com xarope de maltose, a fermentabilidade foi de 75,54% devido a maior concentração de dextrinas. Brunelli, Mansano e Venturini Filho (2014), que realizaram nove tratamentos, combinação de três concentrações de extrato original (11, 13 e 15 °Brix) e três porcentagens de mel na formulação do mosto (0%, 20% e 40%), relataram que o mel apresentou maior fermentabilidade do que o malte. Por exemplo, o extrato aparente do mosto com 0% de mel e com concentração de extrato de 13°Brix correspondeu a 3,45% e o mosto com 40% de mel e a mesma concentração de extrato, apresentou 1,37%.

A produtividade volumétrica (Q_p) foi maior no meio com concentração de 50% de adjunto (0,47 g/L.h) em comparação com 0,45 g/L.h no mosto com 30%, 0,42 g/L.h do mosto com concentração de 10% e 0,40 g/L.h no mosto com 0%. O rendimento aparente em etanol ($Y_{p/s}$) foi semelhante para todos os mostos contendo adjunto na formulação (0,42g/g), valor este maior que o $Y_{p/s}$ no mosto sem adjunto (0,41 g/g). Carvalho *et al.*(2009) avaliaram os parâmetros fermentativos do mosto puro malte (12°P) e do mosto contendo banana como adjunto (12°P). O primeiro obteve Q_p igual a 0,50 g/L.h e $Y_{p/s}$ equivalente a 0,43 g/g. Já o segundo apresentou Q_p correspondente a 0,58g/L.h e $Y_{p/s}$ igual a 0,45g/g. Podendo-se observar que apesar da levedura utilizada pelos autores ter sido diferente da que foi utilizada neste trabalho, pode-se verificar que a presença da polpa de melão de caroá como adjunto contribuiu para o processo fermentativo.

5.4. Tratamento estatístico dos parâmetros fermentativos em escala laboratorial

Através do tratamento estatístico dos parâmetros fermentativos (fermentabilidade aparente, produtividade volumétrica (Q_p) e fator real de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$) (Tabela 5.7), pode-se verificar que houve diferença significativa entre os mostos fermentados no tempo final da fermentação primária (96h). Sendo que em relação à fermentabilidade e ao Q_p , teve diferença significativa para todos os mostos, no entanto, quanto ao $Y_{p/s}$, as amostras com 10%, 30% e 50% não apresentaram diferença significativa entre si, apenas em relação ao mosto com 0% de adjunto.

A partir destes resultados, pode-se verificar que o mosto com 50% de adjunto apresentou melhores respostas, sendo esta formulação utilizada para o teste em escala piloto.

Tabela 5.7 - Tratamento estatístico dos parâmetros fermentativos do final da fermentação de mostos com diferentes concentrações de adjunto.

Parâmetros fermentativos	Concentração de adjuntos			
	0%	10%	30%	50%
Fermentabilidade aparente (%)	76,63 ± 0,05 ^{a1}	79,32 ± 0,05 ^{a2}	85,84 ± 0,06 ^{a3}	89,42 ± 0,10 ^{a4}
Qp (g/L.h)	0,40 ± 0,01 ^{a1}	0,42 ± 0,11 ^{a2}	0,45 ± 0,07 ^{a3}	0,47 ± 0,02 ^{a4}
Yp/s (g/g)	0,41 ± 0,06 ^{a1}	0,42 ± 0,01 ^{a2}	0,42 ± 0,00 ^{a2}	0,42 ± 0,01 ^{a2}

Notas: Dados apresentados como médias ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.5. Produção da cerveja com 50% de adjunto em escala piloto

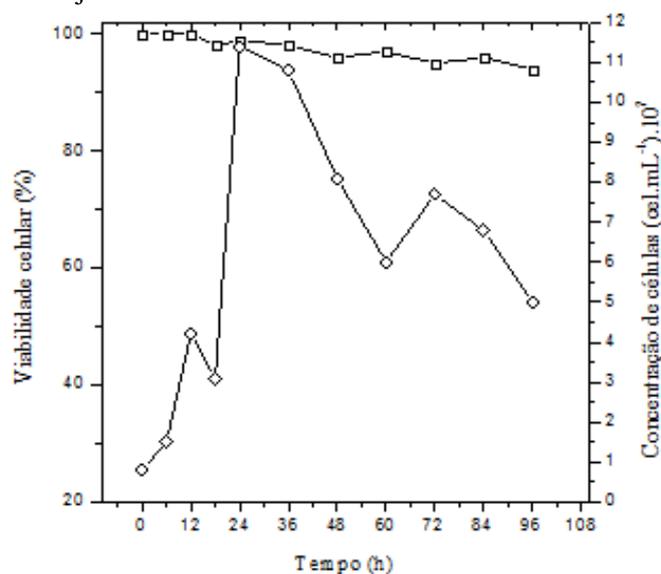
5.5.1. Acompanhamento analítico da fermentação em escala piloto

Para análise dos dados, foram plotados os seguintes gráficos: concentração celular e viabilidade celular, perfil do consumo de açúcares, consumo substrato e produção de etanol, assim como concentração de glicerol e de ácidos orgânicos. Sendo que todas estas variáveis encontram-se função do tempo.

5.5.1.1. Concentração celular (células em suspensão) e viabilidade celular

A fermentação primária teve duração de 96h, tempo este que está de acordo com Siqueira, Bolini e Macedo (2008) que relataram que o processo fermentativo com a levedura tipo *ale* dura de 2 a 5 dias. A partir da Figura 5.4, que apresenta a concentração celular e a viabilidade celular durante esta etapa, pode-se observar a inexistência da fase *lag* que pode ser devido ao meio fermentativo possuir características semelhantes ao meio de propagação.

Figura 5.4- Perfis de viabilidade celular (\square) e de concentração celular das células viáveis (\diamond) durante a fermentação do mosto 50% de adjunto.



Do início da fermentação até às 24h, a viabilidade celular encontrou-se entre 98% a 100%. Após as 36h, iniciou-se o processo de declínio celular com viabilidade de 98-91%. Conforme Briggs *et al.* (2004), a fase de crescimento pode ser interrompida quando um subproduto do metabolismo atinge uma concentração inibitória, porém isso acontece usualmente quando a concentração de nutrientes é reduzida a um nível que limita a taxa de crescimento, desacelerando assim a fase de crescimento. A viabilidade celular da levedura afeta diretamente o desempenho da fermentação e a qualidade final da cerveja (SMART, 2000). E de acordo Guido *et al.* (2004), é um requisito muito importante avaliar a viabilidade celular, assim como o desempenho da levedura durante a fermentação.

5.5.1.2. Perfil do consumo de açúcares durante a fermentação primária

De acordo com Stewart (2009), o mosto contém os seguintes açúcares fermentáveis: sacarose (1-2%), glicose (10-15%), frutose (1-2%), maltose (50-60%) e maltotriose (15-20%). Neste trabalho, foram determinadas as concentrações destes açúcares, com exceção da sacarose, no mosto puro malte e no mosto com 50% de adjunto. Na Tabela 5.8, são apresentadas as concentrações desses açúcares.

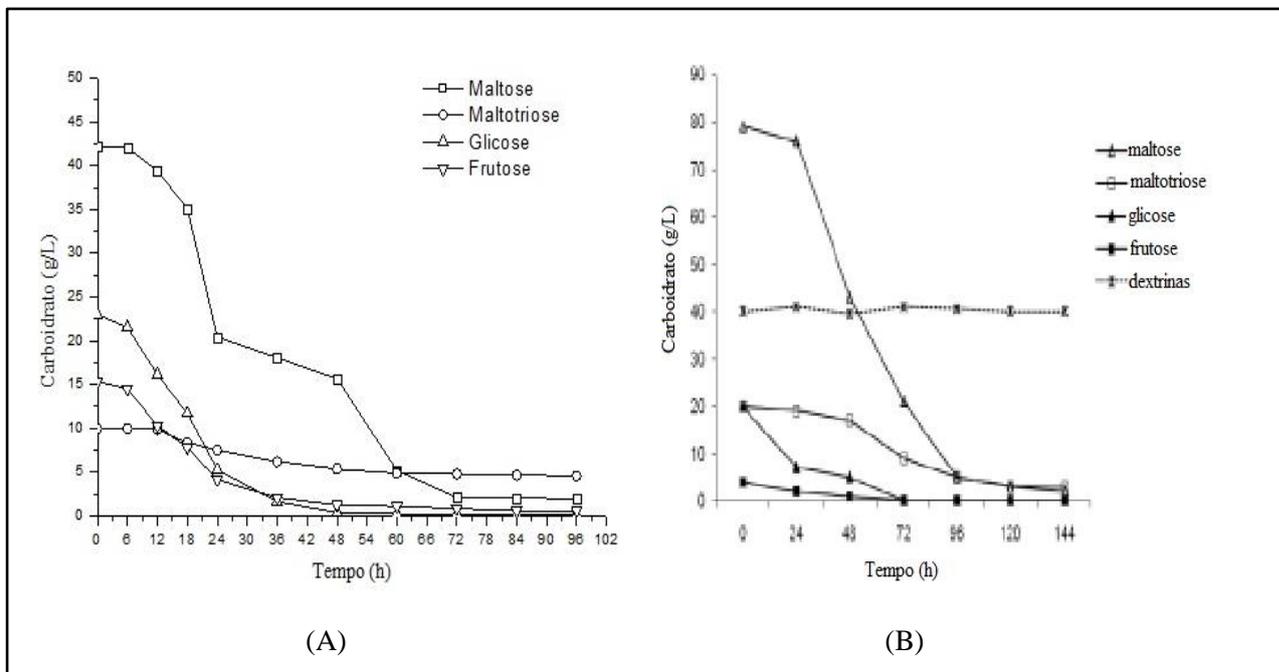
Tabela 5.8 - Concentração de açúcares fermentáveis no mosto puro malte e no mosto com 50% de adjunto.

Carboidratos	Mosto puro malte	Mosto com 50% de adjunto
Glicose (%)	10,86	25,43
Frutose (%)	1,93	16,90
Maltose (%)	70,00	46,62
Maltotriose (%)	17,21	11,03

Pode-se observar a que a adição do adjunto reduziu 33,4% da concentração de maltose e 35,9% de maltotriose, assim como aumentou em 57,43% e 88,58% o teor de glicose e de frutose respectivamente. As concentrações dos açúcares no mosto puro malte apresentaram-se dentro da faixa relatada por Stewart (2009), com exceção da maltose, que apresentou um valor superior. No entanto, o mosto com 50% de adjunto por ter suas características alteradas, uma vez que se utilizou outra fonte de carboidrato, obteve valores fora das faixas expostas pelo autor.

Na Figura 5.5, é apresentado o consumo desses açúcares durante o processo fermentativo. Observou-se que ocorreu inicialmente a assimilação simultânea da glicose e frutose, em seguida da maltose e por fim, a maltotriose. Conforme Stewart (2009) a levedura consome os açúcares, geralmente, na seguinte ordem: sacarose, glicose, frutose, maltose e maltotriose, embora possam ocorrer sobreposições. Briggs *et al.* (2004) relatam que a frutose e glicose são consumidas simultaneamente. Ao comparar os resultados desse trabalho com aqueles apresentados por Stewart (2009) na Figura 5.5, pode-se perceber uma certa similaridade na assimilação dos açúcares. Carvalho *et al.* (2009) observaram a seguinte ordem de consumo dos açúcares: glicose foi consumida primeiro, seguida pela frutose e maltose, e finalmente maltotriose.

Figura 5.5 – Comparação dos perfis do consumo de açúcares no processo fermentativo do mosto com 50% de adjunto (A) e adaptado de Stewart (2009) (B).



Fonte – A : Autor , B: Adaptado de Stewart (2009).

Nesse trabalho, foi possível notar uma curta fase lag (6 a 12h) da maltotriose e maltose, podendo-se inferir que isto pode ter sido ocasionada pela alta concentração de glicose no tempo supracitado. Uma assimilação considerável de todos açúcares foi notada a partir das 24h, tempo este que a concentração celular atingiu o valor máximo (Figura 5.1). Conforme Vidgren (2010), a maltose e maltotriose, usualmente, não são consumidas no início da fermentação, tendo uma fase lag antes de serem assimiladas. A demora, na maioria das vezes, é devido ao fato da glicose ser o açúcar preferido pelas leveduras como fonte de carbono e energia. O mecanismo pelo qual a glicose causa esse retardo ocorre por repressão catabólica e inativação catabólica de enzimas e transportadores necessários para a utilização de açúcares alternativos. Segundo Briggs *et al.* (2004), em mostos ricos em glicose, as leveduras podem não ser capazes de metabolizar a maltose e maltotriose, levando a retardar ou suspender a fermentação.

A partir das 24h, houve um aumento considerável no consumo de todos açúcares: 77% de glicose, 73% de frutose, 51,56% de maltose e 25% de maltotriose. Neste trabalho, observou-se que no tempo supracitado, o consumo da glicose correspondeu a 77%, podendo

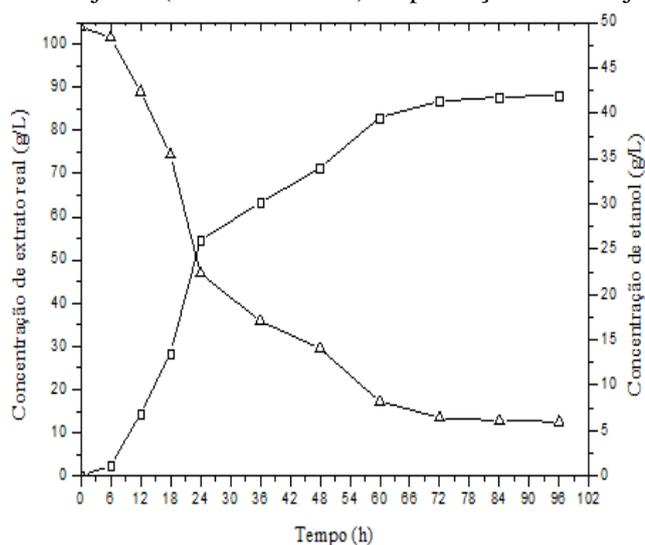
ter colaborado no aumento do consumo da maltose. Stewart e Russel (1993) relataram que apenas quando 60% da glicose do mosto tiver sido consumida pelas leveduras, inicia-se o metabolismo da maltose.

O consumo da maltotriose ocorreu lentamente e correspondeu a apenas 58,27% no final da fermentação. Ainda segundo Stewart e Russel (1993), o consumo de maltotriose é inibido pela alta concentração de glicose e maltose. Conforme Vidgren (2010), ressalta que, além do consumo tardio, algumas vezes, maltose e especialmente, a maltotriose são encontradas no final da fermentação principal.

5.5.1.3. Consumo de substrato e produção de etanol

Para a determinação dos açúcares totais foram considerados os seguintes açúcares fermentáveis: glicose, frutose, maltose e maltotriose, sendo que a maltose e maltotriose tiveram seus valores transformados estequiometricamente em glicose. A Figura 5.6 apresenta o consumo do substrato e a produção de etanol durante o processo fermentativo.

Figura 5.6- Perfis da concentração de extrato real (g/L) (Δ) e da produção de etanol (g/L) (\square) no processo do mosto com 50% de adjunto (melão de caroá) na produção da cerveja.



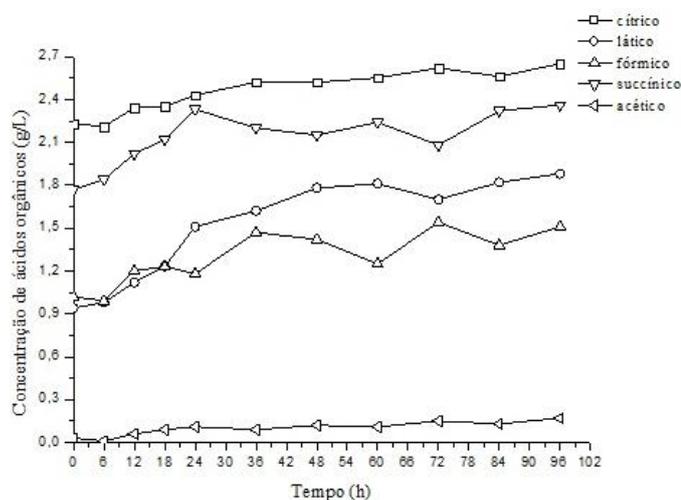
No final da fermentação primária (96h), observou-se que houve uma produção de etanol de 41,98 g/L, que correspondeu a 5,32% v/v. Porém este teor de etanol alcançou 5,5% no final da maturação. Segundo Vidgren (2010), mosto com gravidade original de 11- 12°P

resulta em cerveja com teor alcoólico de 4 a 5 % v/v. É importante destacar que essa relação depende também do perfil de açúcares presentes no mosto. Então, como a cerveja neste trabalho foi produzida, utilizando 50% de adjunto, o meio foi favorecido com uma maior concentração de açúcares fermentáveis, uma vez que reduz-se, por exemplo, o teor de dextrinas (açúcares não metabolizados pela *Saccharomyces cerevisiae*), favorecendo assim a produção de etanol. Carvalho *et al.* (2009) a partir da comparação da fermentação do mosto puro malte e do mosto contendo suco de banana como adjunto, ambos com concentração de 12°P, pode-se notar que ocorreu uma maior produtividade volumétrica (0,58 g/L.h) ao utilizar o adjunto e com o mosto puro malte a produtividade correspondeu a (0,50 g/L.h), uma vez que além do perfil de açúcares fermentáveis da banana, diferentes nutrientes colaboraram para os melhores resultados.

5.5.1.4. Concentração de ácidos orgânicos durante a fermentação primária do mosto com 50% de adjunto

Na Figura 5.7, é mostrada a concentração de alguns dos ácidos supracitados durante a fermentação primária, podendo-se observar que houve um aumento na produção dos ácidos durante o processo fermentativo, ocorrendo reassimilação de alguns em determinados tempos. De acordo com Briggs *et al.* (2004), durante o processo fermentativo, ocorre uma redução substancial do pH e uma das razões para este fato é a produção de ácidos orgânicos, tais como láctico, cítrico, pirúvico, málico, acético, fórmico, succínico e butírico. Sendo que ao longo da fermentação, alguns deles podem ser reassimilados.

Figura 5.7- Perfil da concentração de ácidos orgânicos (g/L) durante a fermentação do mosto com 50% de adjunto



No final da fermentação, as concentrações dos ácidos cítrico, láctico, fórmico, succínico e acético no final da fermentação foram respectivamente: 2,65 g/L; 1,88 g/L; 1,51 g/L; 2,36 g/L e 0,17 g/L. Klopper *et al.* (1986) determinaram a concentração de alguns ácidos orgânicos no final da fermentação da cerveja *Pilsen*, encontrando 0,15 a 0,23 g/L de ácido cítrico; 0,02 a 0,041 g/L de ácido acético e 0,015 a 0,047 de ácido láctico. Os valores encontrados neste trabalho apresentam-se superiores aos relatados (Tabela 4.1). Na literatura, não foram encontrados dados relacionados aos ácidos fórmico e succínico no final da fermentação primária.

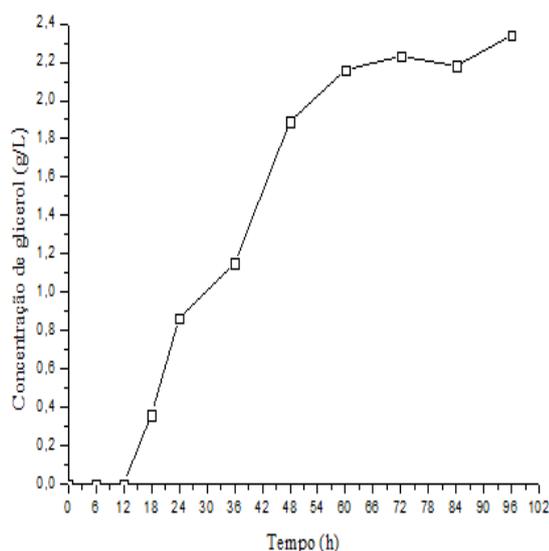
Sendo importante destacar que com a ampliação da escala ocorreu uma redução nas concentrações destes ácidos.

5.5.1.5. Concentração de glicerol durante o processo fermentativo do mosto com 50% de adjunto

A concentração final de glicerol do mosto fermentado com 50% de adjunto foi de 2,34 mg/L, valor menor do que o verificado em escala laboratorial (2,94 g/L). Observou-se que durante as primeiras 12h, não houve produção desse composto secundário, ao passo que o etanol já estava sendo produzido, como mostrado na Figura 5.8. A partir das 18h, foi detectada a produção de glicerol. Na escala laboratorial, notou-se também que a produção deste composto iniciou-se após as 12h. Kopler *et al.* (1986) determinaram a concentração

deste composto no final da fermentação de cerveja *Pilsen*, e os valores encontraram-se entre 1,28 g/L e 1,53 g/L. De acordo com Lima, Basso e Amorim (2001), o glicerol é o composto orgânico secundário mais abundante na fermentação, sua produção está associada à manutenção do equilíbrio redox celular, que por sua vez, é alterado devido à formação de ácidos orgânicos, biomassa e à presença de sulfito no mosto, estando relacionado também a uma resposta ao estresse osmótico.

Figura 5.8 – Perfil da concentração de glicerol (g/L) durante a fermentação do mosto com 50% de adjunto



5.6. Parâmetros fermentativos em escala piloto

A fermentabilidade do mosto com 50% de adjunto correspondeu a 87,94%, valor próximo ao verificado em escala laboratorial (89,42%). Briggs *et al.* (2004) consideram os valores da fermentabilidade na faixa de 64 a 77% como comuns. Estes valores são determinados a partir do conhecimento da concentração de açúcares fermentáveis e dextrinas. Como a utilização do adjunto tende a reduzir o teor de dextrina, a fermentabilidade tende a aumentar, caso não ocorra também uma suspensão da fermentação devido à repressão catabólica. Neste trabalho, o teor de glicose apenas retardou o consumo da maltose e maltotriose nas primeiras 12h, mas não comprometeu o processo fermentativo.

A produtividade volumétrica em etanol apresentou variação durante o processo fermentativo, sendo que no final da fermentação primária, a mesma correspondeu a 0,45 g/L.h

e o fator de conversão de substrato em produto (0,47 g/g), sendo o valor próximo do valor teórico proposto por Gay-Lussac (0,511g/g). Os valores da produtividade volumétrica e do fator de conversão foram próximos aos verificados em escala laboratorial (0,47 g/L.h e 0,42 g/g), respectivamente.

Em relação aos dados obtidos do Qp e Yp/s, Carvalho *et al.* (2009), apesar de utilizar a levedura tipo *lager*, verificaram que a utilização do adjunto (suco de banana) conferiu o aumento do Qp (0,58 g/L.h) e Yp/s (0,45 g/g).

5.7. Caracterização físico-química da cerveja com 50% de adjunto

A cerveja elaborada com 50% de adjunto foi caracterizada físico-quimicamente de acordo com os dados apresentados nas Tabelas 5.9 e 5.10.

Tabela 5.9 – Características físico-químicas da cerveja com 50% de adjunto

Parâmetro	Média± DP
pH	4,3 ± 0,11
Proteína(%)	0,21 ± 0,08
Cor (EBC)	9,00 ± 0,15
Amargor (IBU)	10,2 ± 0,11
Glicerol (g/L)	2,38 ± 0,21

Nota: Dados apresentados como médias ± desvio padrão (n=3).

Tabela 5.10 – Concentração de ácidos orgânicos na cerveja com 50% de adjunto

Parâmetro	Média± DP*
Ácidos orgânicos (g/L)	
Acético	0,19 ± 0,21
Cítrico	2,68 ± 0,08
Fórmico	1,54 ± 0,11
Lático	1,90 ± 0,02
Succínico	2,38 ± 0,17

Nota: Dados apresentados como médias ± desvio padrão (n=3).

O pH antes da inoculação correspondeu a 5,0. Durante o processo fermentativo, houve uma redução substancial deste parâmetro, alcançado pH = 4,3 (Tabela 5.9). De acordo com Briggs *et al.* (2004), esta redução acontece enquanto os íons amônio e aminoácidos são consumidos pela levedura e os ácidos orgânicos são produzidos. Eblinger e Narzib (2012)

afirmam também que durante a fermentação primária o pH decresce devido aos ácidos orgânicos voláteis (acético e fórmico) e os ácidos não voláteis (pirúvico, málico, cítrico e láctico), conferindo à cerveja um pH de 4,3 – 4,6. Araújo, Silva e Minim (2003) afirmam que a cerveja *ale* apresenta pH na faixa de 3-6. Taylor e Organ (2009) relatam que o pH da cerveja está na faixa de 3,8 – 4,3 e que os níveis de acidez pode variar de acordo com a cepa de levedura utilizada. O resultado encontrado neste trabalho está em concordância com aqueles apresentados pelos autores supracitados.

A proteína bruta da cerveja correspondeu a 0,21% (Tabela 5.9). De acordo com Briggs *et al.* (2004) ressaltam que o conteúdo de nitrogênio total multiplicado pelo fator 6,25 é frequentemente expresso como “proteína”. Muitas cervejas contêm 0,11 a 0,63% de proteínas. O valor encontrado está dentro da faixa apresentada pelos autores. Venturini Filho e Nojimoto (1999) que produziram dois tipos de cerveja, uma com água de umidificação e a outra sem água de umidificação, obtendo respectivamente os seguintes teores proteicos 0,32% e 0,28%.

A cerveja produzida com 50% de adjunto enquadrou-se na categoria de cervejas claras, uma vez que, a mesma apresentou coloração de 9,0 unidades EBC (Tabela 5.9) e de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2009), a cerveja é considerada como clara quando possuir a cor correspondente a menos de 20 unidades EBC. A intensidade da cor da cerveja decresceu em relação ao mosto, que apresentou 14,2 unidades EBC. De acordo com Clerk (1958), esta redução deve-se à eliminação da matéria corante na espuma durante o processo de fermentação, assim como pela ação redutora das leveduras sobre os taninos oxidados. Na cerveja produzida com 50% de adjunto, houve uma redução da concentração desses pigmentos. No entanto, é importante destacar que durante o processo fermentativo foi observada um escurecimento gradativo, podendo-se supor que a enzima presente na fruta (polifenoxidase) tenha contribuído para a aparência da cor mais escura. Conforme Briggs *et al.* (2004), a cor da cerveja comumente está relacionada à melanina e ao caramelo presentes no malte. Briggs *et al.* (2004) ainda afirmam que outros fatores que dão cor à cerveja são polifenóis oxidados especialmente na presença de metais como ferro e cobre. Então, este fator também pode ter contribuído para o escurecimento, pois a polpa de melão de caroá apresentou concentração de cobre e ferro maior do que o mosto com 0% de adjunto (Tabela 5.4).

O valor do amargor da cerveja correspondeu 8,2 IBU (Tabela 5.9), valor menor em comparação com o valor encontrado no mosto (9,8 IBU) (Tabela 5.3). Conforme Reinold (1997), uma fração das substâncias amargas é eliminada na camada superior da espuma

formada durante o processo fermentativo. Silva e Faria (2008) estudaram a intensidade do amargor em cervejas de diferentes características e marcas comerciais, ressaltando que com exceção de uma das amostras, as demais apresentaram valores de amargor entre 12 e 27 BU. Então, percebe-se que a cerveja produzida apresentou valor inferior à faixa apresentada pelos autores.

A concentração de glicerol na cerveja foi de 2,38 g/L (Tabela 5.10). De acordo com Briggs *et al.* (2004), este composto secundário atinge uma faixa de aproximadamente 1 a 2g/L. Logo, a cerveja produzida neste trabalho obteve valor próximo ao valor citado pelos autores. No trabalho realizado por Klopper *et al.* (1986), cervejas *ale* apresentaram teor de glicerol um pouco mais alto que cervejas *pilsen*, de 1,5 a 2,9 g/L.

A cerveja produzida apresentou 0,19 g/L de acético (Tabela 5.10). De acordo com Araújo, Silva e Minim (2003), a cerveja pronta, geralmente, não difere da cerveja após a fermentação primária. De acordo com estes autores, a concentração de ácido acético na cerveja normalmente varia de 0,057 – 0,145 g/L.

A concentração de ácido cítrico na cerveja produzida com 50% de adjunto correspondeu a 2,68 g/L (Tabela 5.10). Koppler *et al.* (1986) investigaram a concentração de ácido cítrico em quatro diferentes cervejas *ale*, encontrando os seguintes valores: 0,175 g/L; 0,206 g/L; 0,173 g/L e 0,211 g/L.

Em relação à concentração de ácido láctico, a cerveja apresentou 1,9g/L (Tabela 5.10). Koppler *et al.* (1986) encontrou para as quatro tipos de cervejas *ale* as seguintes concentrações 0,032 g/L; 0,901 g/L; 0,015 g/L e 0,063 g/L

As concentrações de ácido fórmico e succínico foram respectivamente 1,54 g/L e 2,38 g/L (Tabela 5.10). De acordo com Gresser (2009), a cerveja possui 0,02 mg/L de ácido fórmico. Em relação ao ácido succínico, não foram encontrados dados na literatura.

Conforme Bushell (1984), os ácidos orgânicos contribuem para o aroma e sabor da cerveja, assim como influencia na redução do pH, afetando assim as propriedades da cerveja, como estabilidade à turbidez biológica, estabilidade do sabor e percepção do amargor, que aumenta com a elevação do pH.

Ainda, é importante destacar que as diferenças entre os resultados obtidos neste trabalho e aqueles encontrados da literatura podem ter ocorrido porque estão sendo comparadas cervejas resultantes de mostos com características diferentes. Ainda, segundo

Willaert (2007), a produção destes ácidos é influenciada pela cepa da levedura e a velocidade da fermentação.

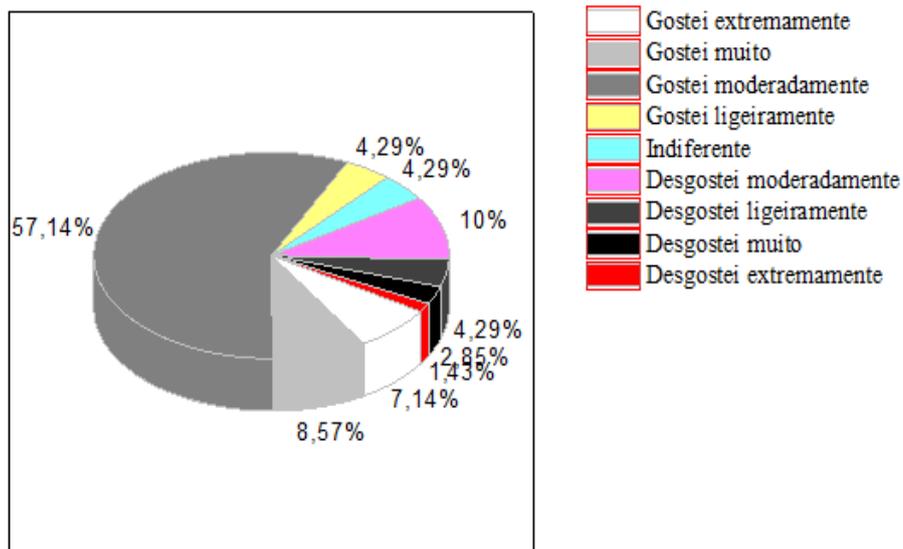
5.8. Análise Sensorial

A cerveja produzida com 50% de adjunto (melão de caroá) (Figura 5.9) teve uma aceitação positiva. Pode-se observar que dos 70 provadores que participaram da análise sensorial, 77,14 % gostaram do produto, porém em relação à intensidade, destacou-se o grupo que afirmou ter gostado moderadamente, representando 57,14% (Figura 5.10). Os provadores que demonstraram ter desgostado do produto são representado por 18,57% dos participantes, dos quais, 10% desgostaram moderadamente. Os outros 4,29% posicionaram-se indiferentemente.

Figura 5.9 - Cerveja com melão de caroá do tipo ale com teor alcoólico de 5,5%.

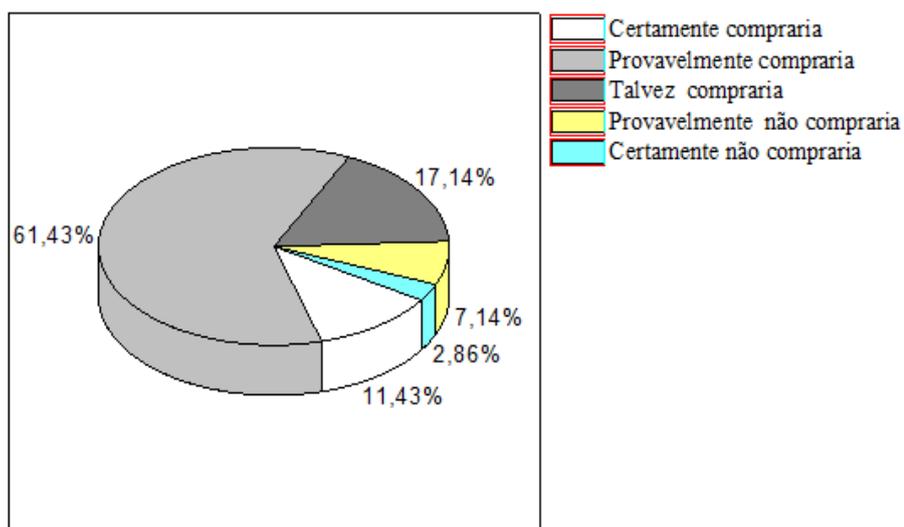


Figura 5.10- Resultado do teste de aceitação da cerveja com melão de caroá



Em relação à intenção de compra (Figura 5.11), obteve-se consequentemente um resultado positivo, uma vez que 72,86% dos provadores comprariam o produto, dos quais 61,43% afirmaram que provavelmente comprariam. Os provadores que não comprariam o produto representaram 10% dos provadores, sendo que a maior parte deste provavelmente não comprariam. Apenas um grupo de 17,14% mostrou-se em dúvida.

Figura 5.11- Resultado da intenção de compra dos provadores em relação à cerveja.



Como várias observações foram feitas por alguns provadores, algumas possibilitaram inferir as razões dos resultados obtidos. Das propriedades organolépticas do produto, o aroma

foi o que se destacou em termos de aprovação dos consumidores, sendo ressaltado o aroma frutado da bebida. No que se refere à cor do produto, houve alguns observações em relação a sua aparência turva, porém sem causar rejeição. Isso proveniente da comparação com as cervejas comerciais. No entanto, este fato pode ser justificado pela inexistência de um processo de filtração eficiente ou até mesmo pela alta concentração de adjunto utilizado. Em relação ao sabor, os provadores demonstraram aprovação, conceituando o produto como bastante refrescante, no entanto, com amargor acentuado. Smith (2009) afirma que a adição do mel conferiu à bebida uma sensação alcoólica suave. Quanto ao critério textura, alguns provadores ao associar com as cervejas comerciais, acharam-na menos encorpada. Oetterer, Regitano-D'Arce e Spoto (2006) ressaltaram que as dextrinas como não são metabolizadas pelas leveduras, permanecem na cerveja, conferindo a mesma “corpo”. Neste trabalho, como houve uma diluição destes açúcares, comprometeu relativamente esta característica. Segundo Smith (2009), o uso do mel proporcionou uma bebida menos encorpada.

6. CONCLUSÃO

A polpa de melão de caroá (*Sicana odorifera*) é uma fruta que possui, de fato, características bastante apreciáveis. E dos parâmetros avaliados, destacaram-se a concentração de carboidratos e minerais na fruta.

Foi possível prever a contribuição significativa da presença do melão de caroá na composição do mosto cervejeiro, por exemplo, por ter conferido ao mosto o aumento da concentração de certos minerais essenciais para o processo fermentativo e para o crescimento da levedura.

Os mostos com maior concentração da polpa de melão de caroá proporcionaram um melhor desempenho fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae* e conseqüentemente forneceu melhores parâmetros da fermentação. Com a ampliação em escala piloto, pode-se perceber que o desempenho do processo também conferiu resultados satisfatórios. Além de se obter um produto com características físico-químicas desejáveis, com exceção para a cor, uma vez que ocorreu escurecimento do meio, fato este que não foi esperado, mas que desperta para possíveis controles prévios.

Com a análise sensorial, pode-se confirmar o potencial do melão como adjunto, e pelas observações feitas pelos provadores foi possível perceber que os pontos que não agradaram aos mesmos, são facilmente solucionáveis, uma vez que não houve rejeição quanto à utilização da fruta como adjunto, podendo-se talvez diminuir a concentração da polpa, que apesar de ter contribuído muito com o processo fermentativo, produziu uma cerveja muito menos encorpada, por exemplo.

Diante dos benefícios supracitados, é possível produzir uma cerveja do tipo *ale* utilizando o melão de caroá como adjunto.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante do trabalho desenvolvido, percebeu-se que foram inúmeras as vantagens da utilização de polpa de frutas como adjunto tanto em relação ao aspecto fermentativo quanto ao sensorial. Então, seria de fundamental importância a ampliação de pesquisas com outras frutas, que possuem características físico-químicas e sensoriais apreciáveis, e que, no entanto, não foram exploradas. Como exemplo, existe outra espécie de melão de caroá denominada de *Sicana atropurpurea*, que pode ser também uma fruta com potencial para aplicação biotecnológica.

Foram testadas quatro concentrações de adjuntos no mosto (0%, 10%, 30% e 50%). Como na análise sensorial, foi relatada a ausência de “corpo” na cerveja e isso se deve a alta concentração de adjunto, podendo-se, então, serem testadas concentrações entre 30% e 50%.

É essencial um tratamento enzimático a depender da natureza da polpa a fim de reduzir a viscosidade do mosto, assim como evitar reações indesejáveis, com o escurecimento enzimático.

Seria também interessante a realização de uma análise sensorial através da técnica de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ).

REFERÊNCIAS

AIZEMBERG, R. **Emprego do Caldo de Cana e do Melado como Adjunto de Malte de Cevada na Produção de Cervejas**, 2015. 272 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2015.

ALMEIDA E SILVA. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G.W. **Tecnologia de Bebidas: Matéria- Prima, Processamento, BPF / APPCC, Legislação e Mercado**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005, 550p.

ALMEIDA LIMA, U, A.; BASSO, L, C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Edgard Blücher, v.3, p.1-46, 2001.

ALMEIDA, A.R. **Compostos Bioativos do Bagaço de Malte: Fenólicos, Capacidade Antioxidante in Vitro e Atividade Antibacteriana**, 2014. 74f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

ALMEIDA, D. P. F. **Cucurbitáceas hortícolas**. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2002, Disponível em < <http://dalmeida.com/hortnet/apontamentos/Cucurbitaceas.pdf>>. Acesso em 5 set. 2014.

ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; FONSECA, M.L.; MAGALHÃES, C.E.C.; LOPES, M.F.G.; LEMOS, T.L.G. Avaliação de Macro e Micronutrientes em Frutas Tropicais Cultivadas no Nordeste Brasileiro, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.39, n. 3 , p. 581-586, 2009.

ALTERTHUM, F. Elementos em Microbiologia. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.1. Edgar Blücher, Brasil, 2001, p. 01-32.

AMBEV. **Cervejas**. Disponível em:< <http://www.ambev.com.br>>. Acesso em 17 nov. 2014.

ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial**, 1994. 178 f. Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1994.

ARAÚJO, F.B.; SILVA, P.H.A.; MINIM, V.P.R. Perfil Sensorial e Composição Físico-Química de Cervejas Provenientes de Dois Segmentos do Mercado Brasileiro, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 121-128, 2003.

ASBC. American Society of Brewing Chemists. **Methods of Analysis of American Society of Brewing Chemists**. 8.ed. Minnesota: Technical Committee and the Editorial Committee of the ASBC, 1996.

AMORIM, H.V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba. São Paulo. Fermentec, 448p, 2005.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RDC n.42, de 29 de Agosto de 2013. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca79f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 04 mai.2016.

AZEREDO DRP. **Síntese e Degradação de Glicogênio e Viabilidade de Levedura Cervejeira**. 1999. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2.ed, York: McGraw-Hill, 1986.

BAMFORTH C. **BEER: Tap Into The Art of Science of Brewing**. 2. ed. Oxford: University Press, 2003.

BAMFORTH, C.W.; LENTINI, A. The Flavor Instability of beer. BAMFORTH, C.W (Ed.). **Beer: A Quality Perspective**. San Diego: Academic Press, 2009.

BARBIERI, R, L.; HEIDEN, G.; NEITZKE, R, S.; GARRASTAZU, M, C.; SCHWENGBER, J, E. Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. **Embrapa**, p. 5-10, 2006.

BATISTA, R.A. **Produção e Avaliação Sensorial de Cerveja com Pinhão (*Araucaria angustifolia*)**, 2014. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2014.

BETRAMELLI, M. **Cervejas, Bregas e Birras: um Guia Completo para Desmitificar a Bebida mais Popular do Mundo**. São Paulo: Leya, 2012.

- BISOGNIN, D.A, Origin and evolution of cultivated cucurbits, **Ciência Rural**, v. 32, n.5, p. 715-723, 2002.
- BORGES, R. M. E.; LIMA, M. A. C, de; DIAS, R. C. S.; RESENDE, G. M. **Caracterização e avaliação Morfo-Agronômica em Abóboras visando à Identificação de Genótipos com Alto Teor de Carotenoides Totais e Resistentes à Mosca Branca para Cultivo no Semiárido Brasileiro**, projeto de pesquisa, Embrapa Semiárido, 2007, 15p.
- BORZANI, W, Cinética de processos fermentativos, **Revista Brasileira de Engenharia**, v.3, n.2, p.61, 1986.
- BOTELHO, B.G. **Perfil e Teores de Aminas Bioativas e Características Físico-Químicas em Cervejas**, 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas, Minas Gerais, 2009.
- BOULTON, C.; QUAIN. D. **Brewing Yeast & fermentation**. London: Blackwell Publishing, 2001, 66p.
- BRÁNYIK, T.; VINCENTE, A.A.; DOSTÁLEK,P.; TEIXEIRA, J.A. Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations, **J. Inst. Brew.**, v. 114, p. 3–13, 2008.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003 - **Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/boletim_vigipos/arquivos/referencias.htm>.
Acesso em 22/01/2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 04. Regulamenta da Lei nº. 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 de junho de 2009.
- BRIGGS. D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing – Science and Practice**, Cambridge: CRC Press, 2004.
- BRUNELLI, L, T.; MANSANO, A.R.; VENTURINI FILHO, W.G. Caracterização Físico-Química de Cervejas Elaboradas com Mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19 – 27, 2014.
- BUSHELL, M.E. **Progress in industrial microbiology**. Oxford: Elsevier, 198p, 1984.

- CABALLERO, I.; BLANCO, C.A.; PORRAS, M. Iso- α -acids, Bitterness and Loss of Beer Quality during Storage, **Trends in Food Science & Technology**, v.26, n.1 p.1-10, 2012.
- CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de Leveduras no Processo de Fermentação Alcoólica em Usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.1, 1999.
- CARVALHO, D, S.; ZAMBIAZI, R. C. Avaliação do Processo Fermentativo de Cerveja Pilsen pelo Uso de Diferentes Concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n.3, p. 351-357, 2011.
- CARVALHO, E.C.P.; COSTA,S.; FRANCO, C.; CURVELO-GARCIA, A.S. Acidificação de Mostos e Vinhos: O Ácido L(+)- Lático em Alternativa ao Ácido L(+)- Tartárico, **Ciência Téc. Vitiv**,v. 14, n, 2, p.67-77, 1999.
- CARVALHO, G.B. M, BENTO, C.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B, Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 3ª parte – A maturação, **Revista Analytica**, n.26, p. 69-74, 2007.
- CARVALHO, G.B.M de. **Obtenção de Cerveja usando Banana como Adjuvante e Aromatizante**, 2009. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.
- CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V, A.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – As leveduras, **Revista Analytica**, n, 25, p.36-42, 2006.
- CARVALHO, G.B.M.; ROSSI, A.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2ª parte – A fermentação, **Revista Analytica**, n. 26, p. 46-54, 2007.
- CARVALHO, G.B.M.; SILVA, D.P.; BENTO, C.V.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A.; FELIPE. M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Banana as Adjunct in Beer Production: Applicability and Performance of Fermentative Parameters. **App. Biochem. Biotechnol.**, v.155, p. 356-365, 2009.
- CEREDA, M.P.; VENTURINI FILHO, W.A. Cerveja, In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.;BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.4, São Paulo: Edgard Blücher, 2005, 523p.

CEREDA, M.P.; VENTURINI FILHO, W.G. Hidrolisado de Fécula de Mandioca como Adjuvante de Malte na Fabricação de Cerveja: Avaliação Química e Sensorial. **Food Science and Technology**, v.18, n.2, 1998.

CETESB. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **Cervejas e refrigerantes**. Serie P+L, São Paulo, 2005.

CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**, Lavras: ESAL/FAEPE, 783p, 2005.

CORAZZA, M.L.; RODRIGUES, D.G.; NOZAKI, J. Preparação e Caracterização de Vinho de Laranja. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p.449-452, 2001.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição Química da Biomassa de Levedura Integral (*Saccharomyces sp.*) e Determinação do Valor Nutritivo da Proteína em Células Íntegras ou Rompidas Mecanicamente. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, n. 2, p. 102-106, 1997.

CRUZ, J.M.M. Cerveja. In: FONSECA, M.M.; TEIXEIRA, J.A. **Reactores Biológicos**. Lisboa / Porto: Lidel, 305p, 2007.

CURI, R. A.; VENTURINI FILHO, W. G.; NOJIMOTO, T. Produção de cerveja utilizando cevada como adjuvante de malte: análises físico-química e sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 106-112, 2009.

CURI, R.A.; VENTURINI FILHO, W.G. Produção de Cerveja utilizando Cevada e Maltose de Milho como Adjuvante de Malte: Análises Físico-química, Sensorial e Isotópica, **Brazilian Journal of Food Technol.**, v. 11, n.4, p.279-287, 2008.

CURI, R.A.; VENTURINI FILHO, W.G.; NOJIMOTO, T. Produção de Cerveja utilizando Cevada como Adjuvante de Malte: Análises Físico-Química e Sensorial, **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.2, p. 106-112, 2009.

CLERK, J. Theory of fermentation. In: DE CLERK, J. **A Textbook of Brewing**. London: Chapman & Hall, v. 1, p.366-402, 1958.

DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F.; LIMA, L.C.O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.23, p. 342-350, 2003.

- DRAGONE, G.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Produção de cerveja pelo sistema contínuo. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010b, p.51-67.
- DUBOIS. M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH. F, Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances, **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EBLINGER, H.; NARZIB, L. Beer. In: **Encyclopedia of Industry Chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012.
- EBLINGER, H. M. ed. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, 2009, p.1-779
- EBC - EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica**. 5.ed. Zurique: Brauerei – und Getränke – Rundschau, 2005.
- FEIJÓ, S. **Técnicas para Execução de Experimentos sob Ambiente Protegido para a Cultura da Abobrinha Italiana**, 2005. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, 2005.
- FENNEMA, O.R. **Química de los Alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1258p., 2000.
- FERREIRA, C.D; PENA, R.S. Comportamento Higroscópico da Farinha de Pupunha (*Bactris gasipaes*), **Food Science and Technology**, v. 23, n.2, p.251-255, mai-ago, 2003.
- FERREIRA, R.H; VASCONCELO, M.C.R.; L; JUDICE, V.M. M.; NEVES, J.T. R, de. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da informação**, Belo Horizonte, vol.16, n.4, p.171-191, out./dez. 2011.
- FILHO, G.X.P.; BARREITA, T.F.; PINHEIRO, S.S.; CARDOSO, L.M.; MARTINO,; H.S.D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Melão Croá' (*Sicana sphaerica* Vell.) and "maracujina" (*Sicana odorifera* Naud.): Chemical Composition, Carotenoids, Vitamins and minerals in native fruits from the Brazilian Atlantic forest, **Fruits**, v.70, n. 6, p.341-349, 2015.
- FILHO, W.G.V.; CEREDA, M.P. Cerveja, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; ALMEIDA LIMA, U. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher ,v.4, p.91 – 182, 2001.

GAN, Q.; HOWELL, J.A.; FIELD, R.W.; ENGLAND, R.; BIRD, M.R.; O' SHAUGHNESSY, C.L.; MEKECHINIE, M.T. Beer Clarification by Microfiltration — Product Quality Control and Fractionation of Particles and Macromolecules, **J. of Membrane Science**, v.194, p. 185-196, 2001.

GARCIA-CRUZ, C.H.; ERNANDES, F.M.P.G. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica, **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.2, p.361-380, 2009.

GEORG-KRAEMER, J.E.; MUNDSTOCK, E.C.; CAVALLI-MOLINA, E.C. Developmental expression of amylases during barley malting, **Journal of Cereal Science**. London, v.33, n.3, p.279-288, 2001.

GRESSER, A. Properties and Quality. In: Eßlinger, H. M. ed, **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**, p.1-779, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Weinheim, 2009.

GUIDO, L. F.; RODRIGUES, P.G.; RODRIGUES, J.A.; CONÇALVES, C.R.; BARROS, A.A. The Impact of the Physiological Condition of the Pitching Yeast on Beer Flavour Stability: An Industrial Approach, **Food Chemistry**, v. 87, p. 187–193, 2004.

HARDISSON, A.; RUBION, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral Composition of the Banana (*Musa acuminata*) from the Island of Tenerife. **Food Chemistry**, v. 73, p. 153-161, 2001.

HILL, A.E. Microbiological Stability of Beer. In: BAMFORTH, C. W, (Ed.). **Beer: A Quality Perspective**. San Diego: Academic Press, 2009.

HIRALAL, L.; OLANIRAN, A.O.; PILLAY, B. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.117, n.1, p. 57-64, 2014.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v.2, p.93 – 122, 2001.

HOUGH, J.S. **Biotechnology of Malting and Brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, p.159, 1985.

HUGHES, P. Beer Flavor. In. BAMFORTH, C.W, (Ed.). **Beer: A Quality Perspective** San Diego: Academic Press, 2009.

HUTKINS, R.W. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. 1^aed, Estados Unidos: IFT Press, Blackwell Publishing, 475p. 2006.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.

JACOBSEN, J.V.; PEARCE, D.W.; POOLE, A.T.; PHARIS, R.P.; MANDER, L.N. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.428-441, 2002.

JARAMILLO, K.; DAWID, C.; HOFMANN, T.; FUJIMOTO, Y.; OSORIO, C. Identification of Antioxidative Flavonols and Anthocyanins in *Sicana odorifera* Fruit Peel, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Colômbia, v.59, n.3, p. 975-983, 2011.

JARAMILLO, K.; DAWID, C.; HOFMANN, T.; FUJIMOTO, Y.; OSORIO, C. Identification of Antioxidative Flavonols and Anthocyanins in *Sicana odorifera* fruit peel. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, n.3, p. 975-83, 2011.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry, **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000.

KIENTEKA, S.S. **Extração e Caracterização dos polissacarídeos dos frutos de *Sicana odorifera***, 2014. 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 2014.

KLOPPER, W.J.; ANGELINO, S.A.G.F.; TUNING, B.; VERMEIRE, H.A. Centenary review. Organic acids and glycerol in beer. **J. Insl. Brew.**, v. 92, p. 225-228, 1986.

KROTTENTHALER, M.; BACK, W.; ZARNKOW. M. Wort Production. In: Eßlinger, H. M. ed. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p.1-779, 2009.

KUNZE, W. La cerveza terminada. In: KUNZE, W. **Tecnología para Cerveceros y Malteros**. Berlín: VLB Berlin, cap. 7, p. 826-885, 2006.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**, 2.ed, Berlin: Vlb Berlin, 726p, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípio de Bioquímica**, 2 ed, São Paulo: Sarvier, 839p, 1995.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDONO, A.M. Mineral Content of Tropical Fruits and Unconventional Foods of the Andes and the Rain of Colombia. **Food Chemistry**, v.95, p. 644-652, 2006.

LEWIS, M.J.; BAMFORTH, C.W. **Essays in Brewing Science**. Nova Iorque: Springer, 179p, 2006.

LIMA, C.A.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COHEN, K.O.; GUIMARÃES, T.G. Características Físico-Químicas, Polifenóis e Flavonoides Amarelos em Frutos de Espécies de Pitaias Comerciais e Nativas do Cerrado, **Ver. Bras. Frutic.**, v.35, n.2, p. 565-570, 2013.

LIMA, J.F.; SILVA, M.P. L.; TELES, S.; SILVA, F.; MARTINS, G.N. Avaliação de Diferentes Substratos na Qualidade Fisiológica de Sementes de Melão de Caroá [*Sicana odorífera* (Vell.) Naudim], **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.2, p. 163-167, 2010.

LIMA, M.A.C.; SILVA, A.L.; AZEVEDO, S.S.N. Evolução de indicadores do ponto de colheita em manga 'Tommy Atkins' durante o crescimento e a maturação, nas condições do vale do São Francisco, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n. 2, p. 432-439, 2009.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v.3. São Paulo: Eduard Blucher, 2001.

LIMA, U.A, **Matéria-Prima dos Alimentos**. São Paulo, SP: Blucher, 2010.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**, n. 65, p. 85-98, 1998.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 672p, 2006.

LUGASI, A. Polyphenol content and antioxidant properties of beer, **Acta Alim.**, v. 32, n.2, p. 181-192, 2003.

LUONG, J.H.T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, p.280-285, 1985.

MADDOX, I.S.; HOUGH, J.S. Effect of Zinc and Cobalt on Yeast Growth and Fermentation. **J. Inst. Brew**, v. 76, p. 262-264, 1970.

- MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1003-1025, 1984.
- MATOS, D.A.; SANTOS, I.J.; COIMBRA, J.S.R. SILVA, P.H.A. Fécula de Batata como Adjuvante na Fabricação de Cerveja, **B.CEPPA**, v. 23, n.1, p. 161-172, jan./jun., 2005.
- McELROY, D.; JACOBSEN, J. What's brewing in barley biotechnology? **Bio/Technology**, v.13, p.245-249, 1995.
- MEGA, J.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. A produção de Cerveja no Brasil. **Citino**, Mato Grosso, v.1, n.1, out./dez. 2011. Disponível em: < <http://www.hestia.org.br/wp-content/uploads/2012/07/CITINOAno1V01N1Port04.pdf>>. Acesso em 15 set. 2014.
- MEILGAARD, M. Composición del Mosto. In: KLIMOVITZ, R. **El cervecero en la práctica**. 3.ed. Minnesota: Master Brewers Association of Americas, 2002.
- MILLER, G.L. Use of de Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MINELLA, E. Safra nacional de cevada cervejeira de 2001. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA PF, RS, 22., 2002, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre, 2002. p.84.
- MINELLA E. Reunião Nacional de Pesquisa de cevada (29: 2013: Passo Fundo, RS). Indicações técnicas para a produção de cevada cervejeira nas safras 2013 e 2014. Editado por Euclides Minella. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 105 p, 2013.
- MIR- MARQUÉS, A.; DOMINGO, A.; CERVERA, M. L.; LA GUARDIA, M. de. Mineral profile of kaki fruits (*Diospyros kaki L.*), **Food Chemistry**, v. 172, p. 291-297, 2015.
- MONTANO, H.G; BRIOSO, P.S.T.; PEREIRA, R.C.; Roberta, C.; PIMENTEL, J.P. *Sicana odorífera* (Cucurbitaceae) a New Phytoplasma Host, **Bulletin of Insectology**. Rio de Janeiro, v.60, n.2, p.287-288, 2007.
- MONTEIRO, C.S.; BALBI, M.E.; MIGUEL, O.G.; PENTEADO, P.T.P.S.; HARACEMIV, S.M.C. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate "Tipo Italiano", **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.1, p.25-31, jan./mar., 2008.
- MORI, C.; MINELLA, E. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 28 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 139).

Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139.htm>. Acesso em 15 out. 2015.

MORTON, J. Cassabanana. In. MORTON, J.F. **Fruits of Warm Climates**. Miami, p.444-445 1987.

MOSER, A. Bioprocess Technology. **Kinetics and Reactors**. New York : Springer – Verlag, 451p, 1988.

MOSHER, R. **Tasting beer: An insider's Guide to the World's Greatest Drink**. North Adams: Story Publishing, 2009, 186p.

MULLER, C.V. **Mapa Atua na Modernização da Legislação do Setor Cervejeiro**.

Disponível

em:<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/informativo%20cerveja%20_2_.pdf>. Acesso em 21 out. 2014.

MULLER, J.L.; PROTTI, K.L.; MACHADO, M.S.; LACERDA, L.L.V.L.; BRESOLIN, T.M.B.; PODLECH, P.S. Comparação do Crescimento de *Saccharomyces boulardii* em Fermentador por batelada tipo *air lifte shaker*. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 4, p.688-693, out.- dez., 2007.

MUNROE, J.H. Aging and Finishing. In: PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. **Handbook of Brewing**, Taylor & Francis Group, 2006.

NAKANO, S. FUJIMOTO, Y.; TAKAISHI, Y.; OSORIO, C.; DUQUE, C. Cucurbita-5,23-diene-3 β ,25-diol from *Sicana odorifera*, **Fitoterapia**, v.75, p.609-611, 2004.

NEVOIGT, L.; STAHL, K.D. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 21, n. 3, p. 231-241, 1998.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, SP: Manole, 612p, 2006.

OLIVEIRA, V.S.; AFONSO, M.R.A.; COSTA, J.M.C. Caracterização Físico- química e Comportamento Higroscópico de Sapoti Liofilizado, **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n.2, p. 342-348, 2011.

PARADA, F.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. Free and Bound Volatile Composition and Characterization of some Glucoconjugates as Aroma Precursors in Melon de Olor Fruit Pulp (*Sicana odorifera*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 12, p. 6200-6204, 2000.

PAVLAK, M.C.M.; ABREU-LIMA, T.L.; CARREIRO, S.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo da Fermentação do Hidrolisado de Batata-Doce Utilizando Diferentes Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Quim. Nova**, v.34, n.1, p. 82-86, 2011.

PELCZAR, M.J.; CHAM, E.C.S.; KRIED, N.R. Os Principais Grupos de Microrganismos Eucarióticos: Fungos, Algas e Protozoários, In: **Microbiologia**, v.1, p. 260-275, Makron Books, Brasil, 1997.

PILLAY, B.; MAHARAJ, Y.R.; OLANIRAN, A.O. Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.14, p.2, 2011.

PINTO, L.I.F. **Acerola (*Malpighia emarginata* DC) e Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) como Adjunto no Processamento de Cerveja: Caracterização e Aceitabilidade**, 2015. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, 2015.

PIRES, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A.A. Yeast: the soul of beer's aroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p.1937–1949, 2014.

REINOLD, M,R, **Manual prático de cervejaria**, São Paulo: Aden, 1997, 214p.

RODRIGUES, W, F. **Variabilidade Genética de Milho (*Zea mays*), Feijão (*Phaseolus vulgaris*) e Cucurbitáceas em Unidades de Produção Agroecológica na Região Sul do Rio Grande do Sul**, 2012. 63f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

ROMANO, C. M.; STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; BEVILAQUA, G. A. P.; RODRIGUES, W. F. **Polinização Manual em Abóboras** -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008, 26p.

RUDIN, A. D.Eur. Brew. Conv. Monograph-I. E. B. C.-Wortsymposium, Zeist, p. 239, 1974.

RUSSEL, I. Yeast. In: HARDWICK, W.A. (Ed). **Handbook of Brewing**. New York: Marcel Dekker, cap.10, p.169-186, 1994.

RUSSELL, I; STEWART, GG. **Brewing**. In: Biotechnology. Vol.9:*Enzymes, Biomass, Food and Feed* (eds G. Reed and T.W. nagodawithana), pp. 419-462. VCH, Weinheim, Germany, 1995.

- SANTOS, C.D.O. **Avaliação do Emprego do Arroz Preto (*Oryza sativa* L.) Submetido à Hidrólise Enzimática como Adjunto na Fabricação de Cerveja**, 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – **Potencial de Consumo de Cervejas no Brasil**, 2014. Disponível em: http://www.sebraemercados.com.br/wpcontent/uploads/2015/12/2014_05_20_RT_Mar_Agrn_Cerveja_pdf.pdf. Acesso em 21 mar. 2015.
- SHELLHAMMER, T.H. Beer Color. In: BAMFORTH, C.W (Ed.). **Beer: A Quality Perspective**. Academic Press: San Diego, 2009.
- SICARD, D.; LEGRAS, J.L. Bread, beer and wine: Yeast Domestication in the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex. **C.R. Biologies**, v. 334, p. 229-236, 2011.
- SILVA, A.E.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V.R.; HERBST JUNIOR, C.G.; HECKTHEUER, L.H.R.; REICHERT, F.S. Elaboração de Cerveja com Diferentes Teores Alcoólicos através do Processo Artesanal, **Alim. Nutr.**, v.20, n.3, p.369-374, 2009.
- SILVA, J.B.A, **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, G.W. **Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgar Blucher, 550p, 2005.
- SILVA, L.M.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; SOUSA, F.C.; SOUSA, E.P.; LIMA, A.K. V.O. Parâmetros Químicos, Físicos e Fisico-Químicos de Três Variedades de Melão. **Revista Brasileira de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, n. 5, p. 242-246, Dezembro, 2011.
- SILVA, P.H.A. da.; FARIA, F.C.de. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p. 902-906, out./dez., 2008.
- SILVETTI, T.; BRASCA, M.; LODI, R.; VANONI, L.; CHIOLERIO, F.; GROOT, M, de.; BRAVI, A. Effects of Lysozyme on the Microbiological Stability and Organoleptic Properties of Unpasteurized Beer, **J. Inst. Bew.**, v. 116, n.1, p.33-40, 2010.
- SIQUEIRA, P.B; BOLINI, H.M.A; MACEDO, G.A. O Processo de Fabricação da Cerveja e seus Efeitos na Presença de Polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.4, p.491-498, 2008.
- SMART, K. The death of the yeast cell. In: **Brewing Yeast Fermentation Performance**. Oxford: Smart, K.(ed.). Blackwell Science, p. 105–113, 2000.

SMITH, B. **Brewing Beer with Honey**. [s.l.]: Beer Smith Home brewing blog, 2009. Disponível em: <<http://www.beersmith.com/blog/2009/09/05/brewing-beer-with-honey/>>. Acesso em: 8 nov. 2014.

SOMDA, M.K.; SAVADOGO, A.; BARRO, N.; THONART.P.; TRAORE.; A.S. Effect of Minerals Salts in Fermentation Process using Mango Residues as Carbon Source for Bioethanol Production. **Asian Journal of Industrial Engineering**, v. 3, n.1, p. 29-38, 2011.

STEWART, G.G. Studies on the Uptake and Metabolism of Wort Sugars During Brewing Fermentations. **Tech Q Master Brew Assoc. Am.** v.43, p. 265–269, 2006.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; REZAEI, K. Advanced Analytical Methods For The Analysis of Chemical And Microbiological Properties of Beer. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, n.2, 2011.

SOHRABVANDI, S.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S.H.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Alcohol-free beer: methods of production, sensorial defects, and healthful effects. **Food Reviews International**, v. 26, n. 4, p. 335-352, 2010.

STEWART, G.G. The Horace Brown Medal Lecture: Forty years of brewing research, **J. Inst. Brew.**, v. 115, p. 3–29, 2009.

STREMEL, D.P. **Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol**, 283p, 2001.

SUZUKI, K.; IJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, p. 173-191, 2006.

TAYLOR, B., ORGAN, T. Sensory Evaluation. In: Eßlinger, H. M. ed, **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, p.1-779, 2009.

TENGE, C. Yeast. In: EßLINGER, H. M. ed. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, p.1-779, 2009.

TEPPENER, H. Notes on Lagenaria and Cucurbita (Cucurbitaceae) - Review and New Contributions, **Phyton**, v. 44, n. 2, p. 245-308, 2004.

TORNIC, H.E. Da Cevada à Bebida. **Revista Alimentos e Tecnologia**, v.1, n.7, p.11-16, 1986.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e Cervejarias**. A Historia, a Arte e a Tecnologia. São Paulo: Aden, 223p, 2001.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de cerveja**. Botucatu: Funep, 2000, 83p.

VENTURINI FILHO, W.G.; NOJIMOTO, T. Aproveitamento da água de umidificação de malte de moagem úmida como matéria prima na fabricação da cerveja, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 174 – 178, 1999.

VENTURINI FILHO, W.G; CEREDA, M.P. Cerveja, In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001, p. 91-144.

VENTURINI FILHO, W.G; CEREDA, M.P. Cerveja, In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001, p. 91-144.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S.; DELVAUX, F.R. Flavour-active esters: Adding fruitness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.96, p.110-118, 2003.

VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Characterization and functional analysis of the MAL and MPH loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.12, p.7846 – 7857, 2005.

VIDGREN, V. **Maltose and Maltotriose Transport into Ale and Lager Brewer's Yeast Strains**. 2010. 158f. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade de Helsinki, 2010.

VIEGAS, M, C, **Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras com Características Flocculantes**, 2003. 150f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

Walker G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: JohnWiley & Sons Ltd., 1998.

WILLAERT, R. **The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation**. Handbook of food products manufacturing. Brussel: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

ZHAO, Y.; LIN, Y.H. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a chemostat under high glucose conditions. **Biotechnology Letters**, v.25, p. 1151-1154, 2003.