



Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

BRUNO RIBEIRO FREIRE

**PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL COM FRUTAS EXÓTICAS E
AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM MICROPARTÍCULAS
MAGNETOPOLIMÉRICAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

BRASÍLIA

2018

Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

BRUNO RIBEIRO FREIRE

**PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL COM FRUTAS EXÓTICAS E
AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM MICROPARTÍCULAS
MAGNETOPOLIMÉRICAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde pelo programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília

ORIENTADOR: PROF. DR, JULIANO ALEXANDRE CHAKER

BRASÍLIA
2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R P964p Ribeiro Freire, Bruno
PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL COM FRUTAS EXÓTICAS E
AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM MICROPARTÍCULAS
MAGNETOPOLIMÉRICAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA /
Bruno Ribeiro Freire; orientador Juliano Alexandre Chaker.
-- Brasília, 2018.
92 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e
Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Produção de cerveja artesanal do estilo Pilsen. 2.
Produção de micropartícula magnetopolimérica. 3. Produção de
cerveja de frutas. 4. Análises físico-químicas de cerveja. 5.
Cinética de fermentação. I. Alexandre Chaker, Juliano,
orient. II. Título.

BRUNO RIBEIRO FREIRE

**PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL COM FRUTAS EXÓTICAS E
AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM MICROPARTÍCULAS
MAGNETOPOLIMÉRICAS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE – Prof. Dr. JULIANO ALEXANDRO CHAKER
Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia
Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

1º MEMBRO – Prof. Dr. MARCELO HENRIQUE SOUSA
Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia
Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

2º MEMBRO – Profa. Dra. ELIANA FORTES GRIS
Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia

3º MEMBRO (SUPLENTE) – Profa. Dra. DANIELA CASTILHO ORSI
Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia

BRASÍLIA
2018

“Nada acontece por acaso. Não existe a sorte. Há um significado por detrás de cada pequeno ato. Talvez não possa ser visto com clareza imediatamente, mas sê-lo-á antes que se passe muito tempo”.

Richard Bach

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e todos os espíritos mentores nesta árdua jornada. Agradeço aos meus pais, Soraia e Maveilson, pelo apoio e puxões de orelha para nunca desistir e sempre seguir em frente. Dedico um carinho especial a minha querida companheira Renata por me apoiar e auxiliar no desenvolvimento do trabalho e ouvir os desabafos. Serei eternamente grato a minha professora e maior mentora acadêmica, professora Daniela Orsi, por me guiar trabalhar comigo para que este projeto fosse possível de se concretizar, você não será apenas uma professora para mim, mas uma amiga para a vida toda. Agradeço ao professor Juliano Chaker pela honra de poder trabalhar comigo e aceitar ser meu orientador, sou grato até pelas chamadas de atenção que contribuíram para meu amadurecimento. Meus maiores amigos, Igor e Rodrigo, têm minha gratidão por todo o suporte e companheirismo na empreitada deste trabalho, sem vocês não conseguiria ter concluído este projeto. Agradeço também aos professores Marcelo Henrique e Eliana Gris por aceitarem participar da banca examinadora e dar suporte no desenvolvimento do meu trabalho.

E mais uma vez estou concluindo mais uma etapa na minha segunda casa e minha maior escola, agradeço a Universidade de Brasília pela hospitalidade e todo aprendizado que tive desde a graduação, jamais me esquecerei dos bons momentos que eu tive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto do lúpulo: [A] Pellets e [B] Flor fêmea de lúpulo. Fonte: SIQUEIRA, 2014..	20
Figura 2: Conversão de glicose em etanol e CO ₂ . Fonte: LIMA & FILHO, 2011	20
Figura 3: Fluxograma do processo da fabricação de cerveja. Fonte: SANTOS & RIBEIRO, 2005	22
Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura demonstrando células de levedura aprisionadas dentro de uma matriz porosa de alginato de cálcio. Fonte: DUARTE et al., 2013	28
Figura 5: Estrutura química do alginato; a) resíduos de ácidos manurônicos; b) resíduos de ácidos gulurônicos; c) resíduos de ácidos manurônicos e gulurônicos alternados. Fonte: KAWAGUTI e SATO, 2008	29
Figura 6: Estrutura química do gel de alginato formado através da ligação dos polímeros com o cálcio. Fonte: KAWAGUTI e SATO, 2008	30
Figura 7: Estrutura química da quitosana e da quitina. Fonte: SIGMA ALDRICH, 2007	31
Figura 8: Estrutura química do glutaraldeído. Fonte: SIGMA ALDRICH, 2007	32
Figura 9: <i>Cross-link</i> entre quitosana e glutaraldeído. Fonte: COVIZZI et al.; 2007	32
Figura 10: Fotos do sapoti (<i>Manilkara sapota</i> L.). Fonte: próprio autor	35
Figura 11: Fotos da atemoia (<i>Annona squamosa</i> x <i>Annona cherimola</i>). Fonte: próprio autor	36
Figura 12: Mosturação do malte realizada durante o processo de fabricação da cerveja artesanal. Fonte: próprio autor	38
Figura 13: Fermentadores de 5 litros utilizados no processo de fabricação da cerveja artesanal. Fonte: próprio autor	40
Figura 14: Leveduras imobilizadas em alginato de cálcio. Fonte: próprio autor	42
Figura 15: Leveduras imobilizadas em matriz de alginato e nanopartículas magnéticas. Fonte: próprio autor	46
Figura 16: Fotos da: a) cerveja sem frutas b) cerveja de sapoti e c) cerveja de atemoia. Fonte: próprio autor	53
Figura 17: Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento experimental para estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas e da concentração de alginato no processo de fermentação alcoólica	59
Figura 18: Cinética de fermentação da cerveja produzida com o uso de leveduras imobilizadas	62

Figura 19: Fotos das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM antes e depois da fermentação alcoólica. 1- Esferas de alginato-NPM antes da fermentação; 2- Esferas de alginato-NPM depois da fermentação. Fonte: próprio autor66

Figura 20: Aplicação das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana na fermentação alcoólica; 1- Esferas com Ferro no início da fermentação; 2- Esferas com Ferro após 144 horas de fermentação com sinais de leveduras livres; 3- Esferas sem Ferro após 144 horas de fermentação com sinais de leveduras livres. Fonte: próprio autor ...68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores decodificados utilizados no planejamento experimental	44
Tabela 2: Análises físico-químicas das cervejas sem adição de frutas, com polpa de atemoia e com polpa de sapoti.....	50
Tabela 3: Atividade antioxidante das cervejas expressa como equivalente em trolox (TEAC), quantificada pelos métodos de ABTS e DPPH	52
Tabela 4: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas e por leveduras livres.....	54
Tabela 5: Análises físico-químicas dos fermentados alcoólicos após cada reuso e peso das leveduras imobilizadas	55
Tabela 6: Influência da concentração de leveduras imobilizadas no processo de fermentação alcoólica	56
Tabela 7: Planejamento composto central 2 ² , codificado e decodificado (valores reais entre parênteses)	57
Tabela 8: ANOVA do planejamento experimental	58
Tabela 9: Análises físico-químicas do mosto e da cerveja produzida com uso de leveduras imobilizadas em alginato	61
Tabela 10: Análises físico-químicas da cinética de fermentação da cerveja produzida com o uso de leveduras imobilizadas	62
Tabela 11: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matrizes de alginato e alginato-NPM.....	65
Tabela 12: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana.....	67
Tabela 13: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matrizes de alginato-NPM, alginato-NPM-glutaraldeído e alginato-NPM-quitosana na fermentação alcoólica.....	69

LISTA DE ABREVIACOES, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

NPM - Nanoprticulas Magnéticas

EUA - Estados Unidos da América

M - cidos Manurônicos

G - cidos Gulurônicos

PEC - Complexo Polieletrólito

ABTS - 2,2-Azino-Bis-(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfonato)

DPPH - 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

Trolox - Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid

h - Horas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Histórico da Cerveja	17
1.2. Constituintes da cerveja: água, malte de cevada, lúpulo e levedura	19
1.3. Definição e classificação das cervejas	21
1.4. Processos industriais de fabricação da cerveja	22
1.4.1. Maltagem	23
1.4.2. Mosturação	24
1.4.3. Fervura	24
1.4.4. Fermentação	25
1.4.5. Maturação	25
1.4.6. Engarrafamento	26
1.5. Inovações tecnológicas na produção de cerveja	26
1.5.1. Imobilização de leveduras e uso de nanopartículas magnéticas	26
1.5.2. Adição de frutas como adjunto cervejeiro	33
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos Específicos	37
3. METODOLOGIA	37
3.1. Matérias primas utilizadas na produção de cerveja	37
3.2. Brassagem (mosturação e fervura do mosto)	37
3.3. Adição das polpas de sapoti e atemoia no mosto cervejeiro	39
3.4. Fermentação	39
3.5. Maturação	40
3.6. Carbonatação e engarrafamento	40
3.7. Análises físico-químicas	40
3.8. Imobilização das leveduras em alginato	41
3.9. Avaliação da atividade de leveduras imobilizadas em alginato durante a fermentação alcoólica	42
3.10. Reuso das leveduras imobilizadas	42
3.11. Estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas no processo de fermentação alcóolica	43
3.12. Planejamento experimental para estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas e da concentração de alginato no processo de fermentação alcóolica	43

3.13. Produção de cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas em alginato e estudo do efeito do sistema imobilizado na fermentação alcoólica.....	44
3.14. Aplicação das leveduras imobilizadas com uso de nanopartículas magnéticas (NPM) na fermentação alcoólica	45
3.14.1 Produção das nanopartículas magnéticas (NPM).....	45
3.14.2. Imobilização das leveduras em matriz de alginato-NPM e aplicação na fermentação alcoólica	45
3.14.3. Imobilização das leveduras em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana e aplicação na fermentação alcoólica.....	46
3.14.4. Influência do uso do glutaraldeído e do uso da quitosana na fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em alginato-NPM	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Análises físico-químicas dos mostos e das cervejas sem adição de frutas, com polpa de atemoia e com polpa de sapoti.....	49
4.2. Avaliação da atividade de leveduras imobilizadas em alginato durante a fermentação alcoólica	53
4.3. Planejamento experimental para estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas e da concentração de alginato no processo de fermentação alcóolica.....	57
Ensaio.....	57
4.4. Produção de cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas em alginato e estudo do efeito do sistema imobilizado na fermentação alcoólica.....	60
4.5. Aplicação das leveduras imobilizadas com uso de nanopartículas magnéticas (NPM) na fermentação alcoólica	64
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS	73
7. ANEXO – Artigo submetido a Brazilian Journal of Food and Technology	80

RESUMO

Esse estudo teve como objetivos a produção de cervejas artesanais no estilo Pilsen com adição das frutas sapoti e atemoia em sua composição e a utilização de leveduras imobilizadas em sistemas micro e nanoestruturados para avaliação dos processos de fermentação alcoólica. A polpa de atemoia foi adicionada no mosto cervejeiro na concentração de 8,5% (p/v) e a polpa de sapoti na concentração de 17% (p/v). A adição de frutas aumentou o teor de compostos fenólicos totais das cervejas de atemoia (111,29 mg/100 mL) e de sapoti (77,61 mg/100 mL) em relação à cerveja sem frutas (64,00 mg/100 mL) e também aumentou o teor alcoólico das cervejas com frutas (5,0°GL) em relação à cerveja sem frutas (4,6°GL). Para a produção da cerveja artesanal no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas utilizou-se a concentração de leveduras 10 % (p/v) imobilizadas em alginato 2 % (p/v). A fermentação alcoólica se completou em 6 dias, quando o teor de sólidos solúveis do mosto (14°Brix) foi reduzido a 7,0°Brix e a cerveja atingiu a graduação alcoólica de 4,9°GL. E no estudo do desenvolvimento de um conjugado de nanopartículas magnéticas (NPM) com as leveduras imobilizadas, as leveduras realizaram a fermentação alcoólica do mosto em 96 horas. O problema apresentado pela matriz de alginato-NPM foi que as nanopartículas de ferro se soltaram do alginato e migraram para o mosto fermentado. Na tentativa de imobilizar as NPM na matriz, foi realizado um ensaio de fermentação alcoólica com uso das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana. Nesse ensaio as NPM ficaram ligadas na matriz e não houve escape de ferro para o mosto. Porém a difusão de substrato para dentro da levedura encapsulada ficou prejudicada e dessa forma não houve fermentação alcoólica do mosto em 96 horas. As sugestões futuras de modificações de metodologia para o uso das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana são: diminuir o tempo de permanência das leveduras imobilizadas na solução de quitosana de 12 horas para 1 hora para que não ocorra fechamento excessivo dos poros da matriz polimérica e fazer primeiro a encapsulação das leveduras no alginato e depois a imersão dessas na solução de glutaraldeído. Dessa forma, as leveduras estarão mais protegidas da toxicidade do glutaraldeído e ainda assim, será possível o glutaraldeído fazer ligações cruzadas com a parte externa do suporte de imobilização, garantindo que as nanopartículas magnéticas fiquem presas no alginato.

Palavras-chave: cervejas com frutas, estilo Pilsen, leveduras imobilizadas, alginato, nanopartículas magnéticas.

ABSTRACT

This study had as objectives the production of artisanal beers in the Pilsen style with the addition of sapoti and atemoia fruits in their composition and the use of immobilized yeasts in micro and nanostructured systems for the evaluation of alcoholic fermentation processes. The atemoia pulp was added to the brewing wort at a concentration of 8.5% (w/v) and the sapoti pulp at the concentration of 17% (w/v). The addition of fruits increased the total phenolic compounds content of atemoia (111.29 mg/100 mL) and sapoti (77.61 mg/100 mL) beers compared to non-fruit beer (64.00 mg/100 mL) and also increased the alcoholic content of beers with fruit (5.0°GL) compared to non-fruit beer (4.6°GL). The concentration of 10% (w/v) yeasts immobilized in 2% (w/v) alginate was used for the production of the Pilsen style beer using immobilized yeasts. The alcoholic fermentation was completed in 6 days, when the soluble solids content of the wort (14°Brix) was reduced to 7.0°Brix and the beer reached the alcoholic grade of 4.9°GL. And in the study of the development of a conjugate of magnetic nanoparticles with the immobilized yeasts, the yeasts carried out the alcoholic fermentation of the wort in 96 hours. The problem presented by the alginate-magnetic nanoparticles matrix was that the iron nanoparticles were released from the alginate and migrated to the wort. In the attempt to trap the magnetic nanoparticles in the matrix, an alcoholic fermentation test was carried out using yeasts immobilized in alginate- magnetic nanoparticles -glutaraldehyde-chitosan matrix. In this assay the magnetic nanoparticles were bound in the matrix and there was no escape of iron to the wort. However, the diffusion of the substrate into the encapsulated yeast was impaired and in this way there was no alcoholic fermentation of the wort in 96 hours. Future suggestions for modifications of methodologies for the use of immobilized yeasts in alginate- magnetic nanoparticles -glutaraldehyde-chitosan matrix are: decrease the residence time of the immobilized yeasts in the chitosan solution from 12 hours to 1 hour so that there is no excessive closure of the polymer matrix pores and first encapsulating the yeasts in the alginate and then immersing them in the glutaraldehyde solution. Thus, yeasts will be more protected from the toxicity of glutaraldehyde and yet, it will be possible for glutaraldehyde to cross-link with the outside of the immobilization support, ensuring that the magnetic nanoparticles are trapped in the alginate.

Key-words: fruit beers, Pilsen style, immobilized yeasts, alginate, magnetic nanoparticles

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo e uma das mais antigas. Por volta de 1842 na cidade de Pilsen, situada na atual República Tcheca, surgiu o estilo *Lager Pilsen*, uma cerveja leve, clara e de baixo teor alcoólico (entre 3 e 5%) que foi originada do armazenamento da cerveja em local resfriado durante a fermentação. A partir de 1874 esse estilo se popularizou no continente americano, pois com advento das máquinas refrigeradoras sua produção foi facilitada. O estilo Pilsen se tornou a preferência da população brasileira pelas suas características leves e refrescantes para o clima tropical. No Brasil, o consumo do estilo Pilsen chega a 98% do total ingerido (BAMFORTH & RUSSEL, 2009; CERVBASIL, 2014).

O Brasil ocupa, atualmente, a 3ª posição mundial na fabricação de cerveja e a 24ª posição mundial em consumo da bebida (CERVBASIL, 2014). As microcervejarias nacionais possuem uma escala de produção na média de 4.160 litros por mês de cerveja e segundo a ABRABRE (2014), aproximadamente 1% da produção nacional é de responsabilidade das microcervejarias, que se concentram principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil. A cerveja artesanal é caracterizada como um produto de excelente qualidade e alto valor de mercado, possuindo aromas e sabores diferentes e está voltada a um mercado-consumidor que busca produtos diferenciados e prioriza um produto de melhor qualidade sensorial (LODOLO et al. 2008; ARAÚJO, SILVA, MINIM, 2003).

Apesar de a cerveja ser a bebida alcoólica mais consumida no país, poucos consumidores têm conhecimento sobre os efeitos benéficos de seus compostos. O consumo moderado de cerveja (1 lata por dia para mulheres e 2 latas por dia para homens) apresenta benefícios à saúde (CERVBASIL, 2014). A cerveja contém compostos antioxidantes e vários estudos comprovam que o consumo regular desses compostos reduz o risco de incidência de doenças como vários tipos de câncer e doenças cardiovasculares (BAMFORTH & RUSSEL, 2009; CERVBASIL, 2014; SOHRABVANDI, MORTAZAVIAN, REZAEI, 2012). As principais fontes de compostos antioxidantes da cerveja são os compostos fenólicos, sendo provenientes da casca de cevada malteada e do lúpulo (GANBAATAR et al., 2015; GERHAUSER, 2005).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento regulamenta a definição da cerveja na Portaria nº 8, de 17 de janeiro de 2014: “Entende-se exclusivamente por cerveja a bebida resultante da fermentação, mediante levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada

ou do extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo. Uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída por adjuntos cervejeiros” (BRASIL, 2014). As frutas são um dos adjuntos possíveis de se utilizar na produção de cerveja artesanal, fornecendo um produto inovador e também sendo uma alternativa em fonte de açúcares para as leveduras realizarem a fermentação alcoólica.

As indústrias utilizam adjuntos cervejeiros variados como alternativas para o processo de produção de álcool. Estas fontes alternativas de açúcares geralmente diminuem o custo produtivo da cerveja, pois a cevada malteada na maioria das vezes apresenta maior custo em relação aos adjuntos. O uso de frutas exóticas na produção de cerveja artesanal é interessante pelo processo inovador, além de introduzir frutos pouco explorados na tecnologia de fermentações. Este trabalho propôs o uso de duas frutas exóticas (sapoti e atemoia) pouco conhecidas na produção de cervejas com frutas.

Frutas tropicais como o sapoti e a atemoia são conhecidas por seu sabor exótico, tendo grande potencial para industrialização. O sapoti (*Manilkara sapota* L.) é nativo da América Central e pertence à família *Sapotaceae*. Apesar de esta planta ter se adaptado às mais diferentes condições de solo, clima e altitude nos trópicos, seu desenvolvimento e produção são favorecidos por altas temperaturas. Assim, no Brasil, os estados nordestinos se destacam na produção de sapoti (MORAIS et al., 2006). A atemoia (*Annona cherimoia*, Mill. x *Annona squamosa* L.) é um fruto nativo das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. A atemoia é uma espécie originada do cruzamento entre a cherimoia (*Annona cherimoia*, Mill.) e a pinha (*Annona squamosa* L.). O fruto maduro apresenta bom rendimento em polpa, com bem menos sementes que a pinha, tem sabor delicado e alto teor de açúcares solúveis (em torno de 20 a 25°Brix) (SILVA et al., 2009; SOBRINHO, 2010).

Outro problema existente na elaboração de cerveja artesanal é o processo de separação de leveduras livres na cerveja verde. O mercado artesanal carece de alternativas tecnológicas para realizar a etapa de clarificação, pois a cerveja artesanal elaborada sem esta etapa apresenta aspecto turvo e geralmente agrada menos os consumidores que estão acostumados com as cervejas filtradas oferecidas no mercado pelas grandes indústrias cervejeiras.

Uma oportunidade de inovação na produção de cerveja é o uso de leveduras imobilizadas na etapa de fermentação alcoólica. Existem muitas vantagens no uso de células imobilizadas de leveduras em relação ao uso de células livres, tais como: sua repetida utilização resultando em economia nos processos industriais; eliminação da operação de remoção de células livres do produto; aumento da estabilidade e metabolismo celular,

resultando em melhor rendimento em etanol e menor tempo gasto para transformação de açúcar em álcool (NIKOLIC et al., 2010; PLESSAS et al., 2007; ZHOU, LI, LI, 2010).

Além da imobilização celular, uma nova alternativa no setor biotecnológico é o método de imantação por adsorção de partícula magnética na célula, enzima ou proteína de interesse. Nanopartículas magnéticas (NPM) feitas com óxido de ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}) já tem uso permitido pelo Food and Drug Administration, órgão sanitário normativo dos Estados Unidos da América (EUA), nas áreas de biotecnologia. Existem várias estratégias para efetuar a conjugação das NPM com biomoléculas, como por exemplo, o encapsulamento destas com polímeros como o alginato. Assim o uso de NPM no processo de fermentação alcoólica irá separar as leveduras da cerveja, resultando em eliminação da operação de remoção de células livres do produto (COLOMBO et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Com isto, este trabalho propõe o uso de micro partículas magneto poliméricas como alternativa tecnológica para otimizar a separação de células de leveduras livres e aprimorar o reuso destas leveduras em vários processos fermentativos.

1.1. Histórico da Cerveja

Desde a antiguidade há relatos da produção de cerveja pelo homem. Há 5500 a.C. foi confirmada a existência de bebidas alcoólicas fermentadas e especificamente de cerveja, por meio de análises químicas realizadas em depósitos residuais de um pote encontrado num campo arqueológico neolítico iraniano (BAMFORTH & RUSSEL, 2009; EBLINGER & NARZIB, 2012).

Na antiga Mesopotâmia (mais precisamente na Suméria) foi achada uma prova arqueológica relativa à produção de cerveja em inscrições rupestres que se referiam a um cereal chamado *emmer* (*Triticum dicoccum*) utilizado para produzir pão e uma bebida alcoólica similar à cerveja. Os pedaços de pães eram imersos em água e deixados para fermentar espontaneamente, através da ação de leveduras selvagens (BAMFORTH & RUSSEL, 2009; EBLINGER & NARZIB, 2012).

Também na China há registros de 4000 anos a.C. da “kiu”, uma cerveja feita à base de cevada, trigo, milho e arroz. O livro dos Mortos, do Antigo Egito, traz menções sobre cerveja fabricada com cevada. Os egípcios inovaram a arte de fazer cerveja e substituíram os pedaços de pães imersos em água por grãos germinados no processo fermentativo (BAMFORTH & RUSSEL, 2009; EBLINGER & NARZIB, 2012).

Na era Medieval, a fabricação de cerveja era feita por vários mosteiros. Nesta produção eram empregadas diversas ervas, com o intuito de aromatizar a bebida, como, mirica, rosmaninho, louro, sálvia, gengibre e o lúpulo. A adição de lúpulo no processo cervejeiro teve sua introdução entre os anos 700 e 800 pelos monges do mosteiro de San Gallo na Suíça (ROSA & AFONSO, 2015; EBLINGER & NARZIB, 2012). As variações relacionadas à proporção dos ingredientes (ervas, água, malte, lúpulo e leveduras) e ao processo de fabricação resultavam em diferentes tipos de cerveja (ROSA & AFONSO, 2015).

A era Contemporânea teve seu início na revolução francesa que ocorreu nas últimas décadas do século XVII (1789 - 1799) e neste período o modo de produção de cerveja sofreu mudanças decisivas durante a revolução industrial. Uma ampla variedade de cervejas surgiu durante o século XVII, sendo que cada variedade era definida pelos diversos ingredientes que eram incorporados, bem como pela qualidade da água presente na sua elaboração. Outro fato de grande destaque neste período (entre o século XVII e XVIII) foi a invenção da máquina a vapor por James Watt, em 1765, o que permitiu a industrialização da produção cervejeira (BAMFORTH & RUSSEL, 2009; EBLINGER & NARZIB, 2012; HORNSEY, 2003).

Já no século XIX, mais precisamente em 1870, Louis Pasteur, o precursor no processo de pasteurização, aplicou seu método pela primeira vez na produção de cerveja. Pouco tempo depois, na região europeia, as cervejarias passaram a adotar o processo de pasteurização como padrão em sua linha de produção. Ainda na década de 1880 houve o acolhimento deste método pelas cervejarias da América (FONTANA, 2009).

No Brasil, o hábito de tomar cerveja teve seu início durante o século XIX, com a chegada de D. João VI, o qual trouxe consigo esta prática e a disseminou durante a permanência da família real portuguesa em território brasileiro. Nessa época, a cerveja consumida no Brasil era proveniente de países europeus. Em 1888, foi fundada na cidade de Rio de Janeiro, a Manufatura de Cerveja Brahma pela empresa Villigier e Cia. Alguns anos depois, em 1891, a Companhia Antártica Paulista foi criada na cidade de São Paulo (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Atualmente essas empresas se difundiram originando a Ambev, a maior empresa cervejeira do Brasil. Em 2004, a Ambev anunciou sua fusão com a cervejaria belga InterBrew, resultando na Interbev, o maior grupo cervejeiro do Mundo (VENTURINI FILHO, 2010). Segundo Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2014), o Brasil produziu 13,5 bilhões de litros de cerveja em 2013 e ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de produção, atrás apenas de China e Estados Unidos. No ano de 2013, as

companhias produtoras de cerveja foram responsáveis por 2% do PIB nacional, gerando um faturamento de R\$ 70 bilhões, o que ressalta a grande importância da indústria cervejeira para a economia brasileira.

1.2. Constituintes da cerveja: água, malte de cevada, lúpulo e levedura

A *Lei da Pureza (Reinheitsgebot)* foi uma norma (aprovada em 23 de abril de 1516 em Ingolstadt, na Baviera, Alemanha) que instituiu que a cerveja deveria ser fabricada apenas com os seguintes ingredientes: água, cevada (malte), lúpulo e levedura. A fabricação de cerveja na Alemanha, Suíça e Grécia segue até hoje a lei da pureza, utilizando apenas esses quatro principais ingredientes na cerveja (EBLINGER & NARZIB, 2012).

A água é o principal constituinte da cerveja respondendo por pelo menos 92% de sua composição. A qualidade da água é um fator determinante na qualidade da cerveja. Assim a água a ser utilizada durante a fabricação da cerveja deve satisfazer os requisitos de uma água potável (limpa, sem cheiro, sem cor e também não pode ter nenhum microrganismo nocivo à saúde) (BARROS & BARROS, 2010). A água a ser utilizada na fabricação da cerveja deve também apresentar características específicas, como pH apropriado (sendo a faixa ideal para a produção de cerveja entre 6,5 a 7,0, variando de acordo com o tipo de cerveja a ser produzida) e uma concentração adequada de sais minerais como o cálcio. O nível de cálcio na água é importante para a estabilidade e sabor da cerveja, estimula a ação enzimática das proteases e amilases, aumentando assim o teor de carboidratos fermentáveis e compostos nitrogenados no mosto (RIO, 2013; VENTURINI FILHO, 2010).

Outro componente essencial na fabricação da cerveja é a cevada. Esse grão é uma gramínea da espécie *Hordeum vulgare*. O cultivo da cevada se dá em regiões de clima temperado. Na América do Sul, a Argentina é o grande produtor e o Brasil também faz produções no Rio Grande do Sul durante o inverno. A composição da cevada em peso seco é de 70-85% de carboidratos (dos quais o amido corresponde a 50-63%), 7-13% de proteínas e 1-1,5% de lipídios. Para o processo de fabricação da cerveja, a cevada passa pelo processo de maltagem. A maltagem é a germinação controlada dos grãos e seu objetivo é desenvolver as enzimas amilases e proteases que serão responsáveis posteriormente por converter o amido em açúcares fermentescíveis e solubilizar as proteínas durante o processo de produção do mosto cervejeiro (RIO, 2013; SOARES, et al., 2007; YALCIN et al., 2007).

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma trepadeira perene originária de climas temperados, sendo bastante cultivada nos EUA e países do norte da Europa. No Brasil não existem condições climáticas adequadas à produção de lúpulo, por isso, todo o suprimento nacional é importado. As flores femininas da planta contêm a lupulina, que é um material resinoso, de sabor amargo, onde predominam resinas e taninos. O lúpulo tem dupla função, a aromática e a que propicia o sabor amargo. Os cachos florais são colhidos da trepadeira e as flores são secas e comercializadas principalmente na forma de pellets (ALMAGUER et al., 2014; MEGA, NEVES, ANDRADE, 2011). A Figura 1 apresenta o lúpulo na forma de pellets, processo em que as flores são secas e prensadas e na forma de flor *in natura*.

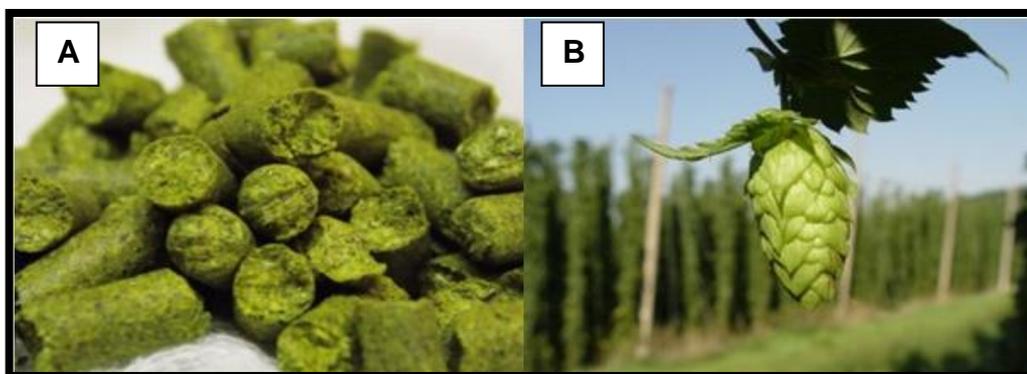


Figura 1: Foto do lúpulo: [A] Pellets e [B] Flor fêmea de lúpulo. Fonte: SIQUEIRA, 2014

As leveduras utilizadas no processo cervejeiro são as do gênero *Saccharomyces* (como *S. cerevisiae* e *S. uvarum*), que tem como função principal a conversão de açúcares fermentescíveis (como glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose) em etanol e gás carbônico e em menor quantidade em outros subprodutos (como glicerol, acetaldeído, butilenoglicol, além de ácidos orgânicos como o succínico, acético e pirúvico). A conversão de açúcares em etanol e gás carbônico por leveduras como *S. cerevisiae* é realizada devido à presença de enzimas (como as enzimas da via glicolítica, a piruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase), as quais promovem diversas reações que terminam por transformar a glicose ($C_6H_{12}O_6$) em etanol (CH_3CH_2OH) e gás carbônico (CO_2), em um processo exotérmico demonstrado na reação da Figura 2 (LIMA & FILHO, 2011).

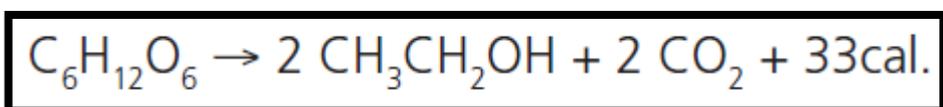


Figura 2: Conversão de glicose em etanol e CO_2 . Fonte: LIMA & FILHO, 2011

As leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem a capacidade de metabolizar açúcares como a glicose, a frutose, a sacarose, a maltose e a maltotriose. Sabe-se que somente a glicose e a frutose serão diretamente fermentadas pelas leveduras e que os demais açúcares necessitam de ação enzimática para serem fermentados. No caso da sacarose, essa é dissociada em glicose e frutose pela enzima invertase e depois fermentada pelas leveduras. Já a maltotriose (3 unidades de glicose) e a maltose (2 unidades de glicose) são levadas para o interior da célula pelo sistema de enzimas permeases e então dissociadas em glicose pela enzima maltase. É muito importante enfatizar que o transporte, hidrólise e fermentação da maltose e da maltotriose (que correspondem a mais de 60% dos açúcares fermentescíveis do mosto) pelas leveduras é fundamental para a elaboração da cerveja (EBLINGER & NARZIB, 2012).

1.3. Definição e classificação das cervejas

No Brasil, a cerveja é definida por meio do Decreto Nº 6,871, de 04 de Junho de 2009, como a bebida obtida por meio da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro proveniente do malte de cevada e água potável, por ação de uma levedura cervejeira, com adição de lúpulo. Ainda dentro deste mesmo decreto a cerveja é classificada quanto, ao extrato primitivo, à cor, ao teor alcoólico, à proporção de malte de cevada e quanto à fermentação (BRASIL, 2009). Dentre as classificações da cerveja, a principal e mundialmente mais difundida é a relacionada com o tipo de fermentação, onde se tem dois grandes grupos, as cervejas do tipo Ale (alta fermentação) e as do tipo Lager (baixa fermentação) (SIQUEIRA, BOLINI, MACEDO, 2008; EBLINGER & NARZIB, 2012).

Na indústria cervejeira distinguem-se fundamentalmente duas espécies de leveduras: *S. cerevisiae* e *S. uvarum* ou *carlsbergensis*. As leveduras mais utilizadas no processo cervejeiro são *S. cerevisiae* para produção de cervejas do tipo Ale e *S. uvarum* (anteriormente denominada *carlsbergensis*) utilizada para produção de cervejas do tipo Lager.

As cervejas tipo Ale (alta fermentação) são antigas, pois já eram produzidas antes do domínio da tecnologia da fermentação. Para as leveduras tipo Ale, o processo de fermentação alcoólica ocorre em temperaturas de 15 a 25°C, com duração de 2 a 5 dias. Esse tipo de cerveja é obtido pela ação da levedura cervejeira, que surge à superfície da fermentação tumultuosa devido à retenção de gás pelas leveduras, por isso o nome “alta fermentação”. Sua fabricação sugere a adição de concentrações mais elevadas de malte e de lúpulo. As cervejas

tipo Ale têm em geral um sabor pronunciado de lúpulo e um maior teor alcoólico que varia de 4 a 8% (BOTELHO, 2009, CARVALHO, 2007; SIQUEIRA, BOLINI, MACEDO, 2008).

As leveduras tipo Lager são utilizadas em temperaturas que podem variar de 7 a 15°C, com duração do processo de fermentação alcoólica de 10 a 15 dias. Nessas temperaturas mais baixas, a levedura tem seu metabolismo de forma mais lenta, e ocorre menos formação de espuma superficial no processo de fermentação alcoólica. Por isso as leveduras tendem a se sedimentar no fundo do fermentador, sendo assim, denominadas leveduras de baixa fermentação. A temperatura e o tipo de levedura têm grande influência no sabor final da cerveja devido às baixas temperaturas usadas no processo. Os sabores e aromas das cervejas Lager são mais suaves em comparação com as Ales (BOTELHO, 2009; CARVALHO, 2007; SIQUEIRA, BOLINI, MACEDO, 2008).

1.4. Processos industriais de fabricação da cerveja

A Figura 3 apresenta os principais processos industriais de fabricação da cerveja: maltagem, mosturação, fervura do mosto, fermentação, maturação e engarrafamento da cerveja.

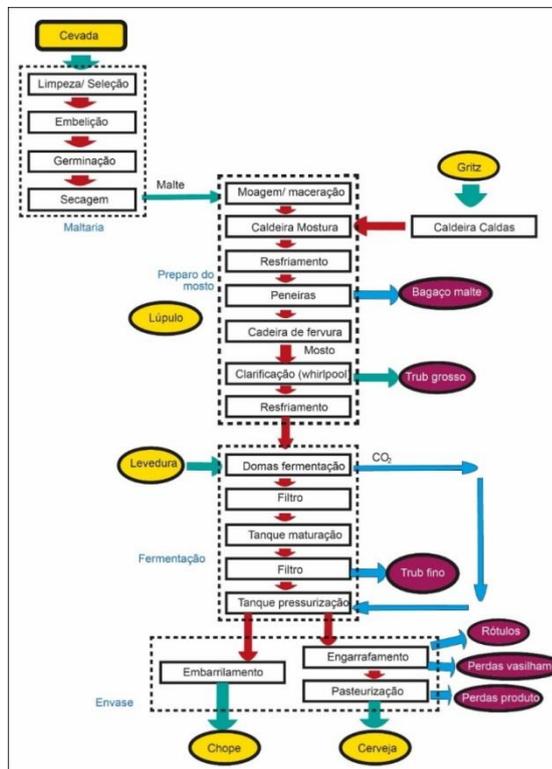


Figura 3: Fluxograma do processo da fabricação de cerveja. Fonte: SANTOS & RIBEIRO, 2005.

1.4.1. Maltagem

O processo de maltagem é realizado em instalações dedicadas a este propósito, conhecidas como maltarias, que podem ou não ser anexas às indústrias cervejeiras. Após passar por um processo de germinação em condições controladas na maltaria (Figura 3), a cevada recebe o nome de malte. Malte é um termo técnico utilizado para definir a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal sob condições controladas. Quando não há indicação, se subentende que é feito de cevada e em qualquer outro caso, é acrescentado o nome do cereal, por exemplo: malte de trigo, malte de centeio e de outros cereais. O objetivo deste processo é desenvolver enzimas e modificar o amido tornando-o mais macio e solúvel (REBELLO, 2009).

A maltagem se divide em quatro etapas principais, descritas na Figura 3, como: operações preliminares de limpeza/seleção, operações de embebição ou maceração, germinação e secagem. As etapas de operações preliminares envolvem limpeza, onde a cevada fica livre de impurezas advindas de sua colheita e classificação dos grãos de cevada. Na fase de classificação, os grãos passam por um processo de calibração e são separados das palhas e dos grãos partidos fazendo com que cheguem ao processo de molha de forma mais uniforme possível, para assim teoricamente se obter o mesmo tamanho e peso. O teor de umidade inicial deve ser de 11 - 12% (MARTINS & RODRIGUES, 2015).

Na molha, a cevada limpa e classificada é submersa em água até obter o teor de umidade desejado, que possibilitará o início da germinação do embrião (MARTINS & RODRIGUES, 2015). O processo é finalizado em aproximadamente dois dias quando um teor de umidade de 42 - 48% é alcançado e neste ponto há o aparecimento da radícula (VENTURINI FILHO, 2010).

Após macerada, a cevada é colocada então para germinar em compartimentos apropriados. Para que o ar úmido ascendente ou descendente atravesse à cevada é comum que os germinadores apresentem fundo falso perfurado, cuja espessura varia, dependendo do processo adotado. Usualmente essa etapa é encerrada quando a estrutura embrionária atinge dois terços do comprimento do grão. O tempo requerido nesta fase pode variar de 3 a 6 dias dependendo dos equipamentos utilizados (CARVALHO, 2007; VENTURINI FILHO, 2010).

O processo de secagem dos grãos de malte é realizado após o processo de germinação. Assim como na germinação, esse processo também ocorre em compartimentos (denominados secadores), os quais apresentam fundo falso e perfurado, para facilitar a passagem do fluxo de

ar. O processo de secagem é dividido em três etapas, onde a temperatura varia respectivamente de 49 – 60°C para 70°C e 88 – 100°C, tendo uma diminuição de umidade dos grãos de 45% para 4 - 5% no malte de cerveja Lager e 2 - 3% no malte de cerveja Ale. É nesta fase que se incorpora a maior parte do sabor característico do malte ao grão (CARVALHO, 2007; VENTURINI FILHO, 2010).

A cevada deve germinar fácil e uniformemente durante a fase de maltagem. O teor ideal de proteínas deve estar entre 9,5 e 11,5%. O poder amilolítico das enzimas deve ser suficiente para hidrolisar a maior parte do amido do malte e dos adjuntos (VENTURINI FILHO, 2010).

Neste trabalho a etapa de maltagem não foi realizada por não se tratar do objetivo deste estudo. As matérias primas obtidas já estavam malteadas conforme o processo descrito acima.

1.4.2. Mosturação

Conforme descrito na Figura 3, a mosturação consiste em misturar o malte moído e água, em dornas com controle de temperatura que iniciam o processo a baixas temperaturas e vão aquecendo por etapas até 75°C. Quando a temperatura estiver a 50°C, estarão agindo as proteases, na temperatura de 60–65°C ocorre a sacarificação do amido gelificado pela β -amilase e a 70-75°C ocorre a dextrinização do amido pela α -amilase. O produto final da mosturação é o mosto cervejeiro que pode ser definido como uma solução, em água potável, de carboidratos, açúcares simples, proteínas, aminoácidos e sais minerais, resultantes da degradação enzimática dos componentes da matéria-prima que compõem o mosto. Ao final da mosturação, procede-se à filtração do mosto, por gravidade, através das cascas do malte que formam uma cama no fundo da dorna (CARVALHO, 2007; SANTOS & RIBEIRO, 2005). Após a filtração do mosto, as cascas do malte (bagaço de malte) são retiradas por uma peneira e assim o processo pode ir para a etapa de fervura.

1.4.3. Fervura

Após a filtragem, o mosto é levado à fervura nas dornas, durante 2 horas. As operações de mosturação e de fervura são designadas de brassagem na cervejaria. Na fervura do mosto ocorre estabilização biológica (os micro-organismos que possam ter sido

introduzidos nas operações anteriores são destruídos); estabilização bioquímica (as enzimas que se mantiveram ativas são inativadas) e estabilização físico-química (as proteínas de maior peso molecular são desnaturadas, precipitam e, com elas, arrastam os polifenóis, tornando o mosto mais limpo). Muitas vezes, o lúpulo é acrescentado quando a fervura está no meio ou mesmo no final. A razão é que os óleos essenciais do lúpulo responsáveis pelo desenvolvimento do aroma são voláteis, podendo perder-se na fervura prolongada (CARVALHO, 2007; SANTOS & RIBEIRO, 2005). Após a fervura e agitação do mosto, procede-se com a etapa de clarificação sob agitação (whirlpool) conforme demonstrado na Figura 3. Nesta etapa as impurezas denominadas de “Trub Grosso” (substratos, proteínas desnaturadas e polifenóis) são decantadas e retiradas. Com isto, a etapa de preparo de mosto é finalizada, conforme descrito no segundo bloco da Figura 3.

1.4.4. **Fermentação**

Após a fervura, o mosto é centrifugado, resfriado e aerado para se fazer a inoculação da levedura cervejeira. Durante a fermentação principal, ocorre a utilização dos açúcares pelas leveduras e produção de CO₂ e álcool. O processo de fermentação dura entre 2 a 5 dias para a cerveja tipo Ale e entre 10 a 15 dias para a cerveja tipo Lager e, ao final se obtém, além do mosto fermentado, uma grande quantidade de CO₂, que após ser purificado é enviado para a etapa de carbonatação da cerveja em grandes indústrias, conforme indicado na Figura 3 (SANTOS e RIBEIRO, 2005).

1.4.5. **Maturação**

A maturação é um repouso prolongado da cerveja a temperaturas baixas (0 a 3°C durante um período de 15 a 60 dias), que contribui para a clarificação da cerveja e melhoria do sabor final. Na maturação há precipitação de proteínas e leveduras; o amargor do lúpulo se atenua e o sabor da cerveja madura se estabelece (CARVALHO, 2007; SANTOS & RIBEIRO, 2005).

A seguir são feitas a clarificação (filtração) e a carbonatação, como operações de acabamento da cerveja. Com o objetivo de remover impurezas que ainda não se decantaram e proporcionar a limpidez final do produto, procede-se a filtração da cerveja após a maturação.

Estas impurezas resultantes da etapa de filtração são chamadas de “Trub Fino” de acordo com a Figura 3.

1.4.6. Engarrafamento

O teor de CO₂ existente na cerveja ao final do processo normalmente não é suficiente para atender as necessidades do produto. Desta forma, realiza-se a carbonatação da mesma, por meio da injeção do gás carbônico reaproveitado da etapa de fermentação (conforme descrito na Figura 3). Após a carbonatação, a cerveja pronta é enviada para envase em barris (chopp) ou é enviada para engarrafamento e pasteurização (cerveja) (CARVALHO, 2007; SANTOS & RIBEIRO, 2005). Em micro cervejarias que utilizam processos artesanais, a carbonatação pode ser realizada com adição de açúcar juntamente de uma pequena quantidade de leveduras para produzirem gás após o engarrafamento (processo similar com o utilizado para produção de espumantes no estilo tradicional de Champenoise) e este foi o método utilizado no processo produtivo deste trabalho.

1.5. Inovações tecnológicas na produção de cerveja

1.5.1. Imobilização de leveduras e uso de nanopartículas magnéticas

Após a fermentação principal, a cerveja verde ainda possui uma suspensão de leveduras. Esta suspensão de leveduras contribui para a turbidez indesejada da cerveja e em indústrias de médio e grande porte é realizado o processo de filtração da cerveja. A necessidade de equipamentos como centrífuga ou filtros e de uma etapa dedicada para realizar a filtração de cerveja aumenta o custo de produção. A separação de leveduras livres no mosto fermentado é um problema, dentro do processo cervejeiro, bem elucidado em alguns trabalhos na literatura (NEDOVIC et al., 2005; DUARTE et al., 2013). Por isso, esses trabalhos buscam alternativas tecnológicas para otimizar esta etapa e uma alternativa seria o uso de leveduras imobilizadas na etapa de fermentação alcoólica. Por meio da separação das leveduras encapsuladas, a etapa de filtração da cerveja seria eliminada, o que resultaria em uma otimização do processo produtivo. O uso desta técnica de separação de leveduras da cerveja impactaria positivamente, principalmente, o micro-produtor em escala artesanal, eliminando a

necessidade de equipamentos caros, diminuindo o tempo de produção e obtendo um produto de qualidade superior (mais límpido) em relação a cerveja artesanal não filtrada.

De forma geral, enzimas e microrganismos livres no meio reacional estão sujeitos à inativação por fatores diversos, podendo ser estes de origem química, física ou biológica, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Desta forma, há necessidade de se estabilizar estes biocatalisadores, como meio de evitar a inativação ou diminuição de sua ação desejada (AMICI et al., 2008). Uma alternativa tecnológica encontrada para aperfeiçoar a ação de organismos celulares como fungos, leveduras ou bactérias é a imobilização celular. A imobilização celular é feita de maneira que seja preservada a atividade catalítica desejada e tem sua utilização tanto em escala laboratorial, quanto industrial (COVIZZI et al., 2007).

Existem muitas vantagens no uso de leveduras imobilizadas em relação ao uso de leveduras livres como: sua repetida utilização resultando em economia nos processos industriais, eliminação da operação de remoção de células livres do produto, aumento da estabilidade e metabolismo celular, resultando em melhor rendimento em etanol e menor tempo gasto para transformação de açúcar em álcool (ALMONACID et al., 2012; DUARTE et al., 2013; ZHOU, LI, LI, 2010). A imobilização feita de forma correta tende a elevar a atividade fermentativa da levedura, promovendo a adaptação das células ao meio. Em sistemas de imobilização celular obtém-se maior massa de células por unidade de volume de trabalho, quando relacionado aos sistemas que têm como princípio a utilização de células livres (OLIVEIRA, 2010; WILLAERT & NEDOVIC, 2006).

Segundo WILLAERT & NEDOVIC (2006) o processo de imobilização celular já foi descrito para as diferentes fases da produção da cerveja como: acidificação do mosto, formação de flavour durante a fermentação secundária (maturação da cerveja verde), fermentação principal e para produção de cervejas sem álcool ou de baixo teor alcoólico. De acordo BERLOWSKA, KREGIEL, AMBROZIAK (2013) apenas algumas poucas tecnologias de imobilização de leveduras propostas na literatura resultaram em produção de cerveja em escala piloto ou implementação industrial.

Duas dificuldades no uso de leveduras imobilizadas na fermentação principal é a manutenção do estado fisiológico desejado das células imobilizadas e a modificação do aroma de cerveja (BERLOWSKA, KREGIEL, AMBROZIAK, 2013; WILLAERT & NEDOVIC, 2006). Durante a fermentação principal, os álcoois superiores são produzidos pelas leveduras como subprodutos da fermentação alcoólica e estes representam a maior fração dos compostos voláteis. Os álcoois superiores alifáticos contribuem com o aroma de álcool na

cerveja. Alguns trabalhos reportaram um decréscimo na produção de álcoois superiores na cerveja por leveduras imobilizadas em relação às leveduras livres. Esse decréscimo foi atribuído ao limitado crescimento celular dos sistemas das células imobilizadas, levando a uma deficiente remoção de nitrogênio.

O uso de imobilização celular em alginato de cálcio tem se destacado, devido principalmente às suas características intrínsecas, como biocompatibilidade, porosidade e facilidade de manipulação. Devido a essas propriedades, o alginato é um dos suportes mais utilizados como matriz para o aprisionamento e/ou liberação de uma variedade de proteínas e células (DUARTE et al., 2013). A imobilização celular por aprisionamento em uma matriz porosa é baseada na inclusão de organismos celulares no interior de uma rede rígida, impedindo desta forma que as células se difundam para o meio exterior, permitindo simultaneamente a transferência de nutrientes e metabólitos (OLIVEIRA, 2010). Pode-se observar na Figura 4 várias leveduras dentro da matriz polimérica de alginato.

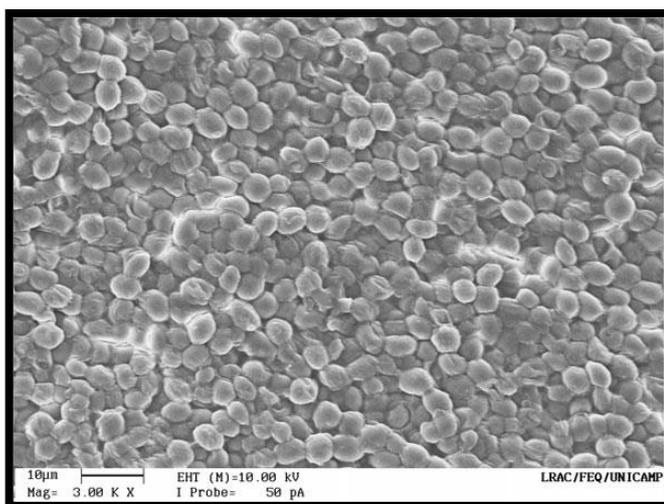


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura demonstrando células de levedura aprisionadas dentro de uma matriz porosa de alginato de cálcio. Fonte: DUARTE et al., 2013

O alginato é um polissacarídeo natural, não tóxico, extraído de algas marrons como *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystispyrifera*, nas quais o alginato compreende até 40% de seu peso seco. O alginato apresenta estrutura molecular linear, o qual contém resíduos de ligação de β -D- ácido manurônico e α -L- ácido gulurônico, unidos entre si por ligações glicosídicas 1,4, em várias proporções e arranjos. O alginato varia extensamente em termos de proporção entre os resíduos de ácidos manurônicos (M) e de

ácidos gulurônicos (G), bem como em sua estrutura sequencial e grau de polimerização. Desta forma, o alginato pode apresentar sequências alternadas de resíduos MG e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G (Figura 5) (AMICI et al., 2008; KAWAGUTI e SATO, 2008).

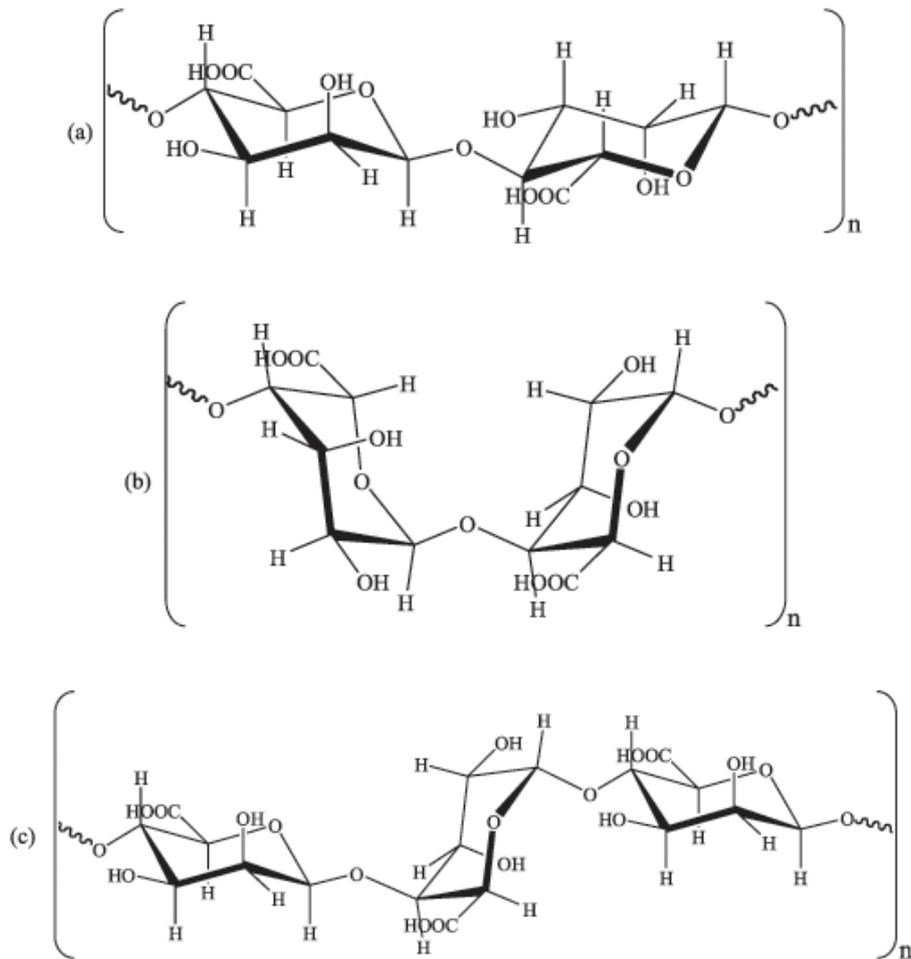


Figura 5: Estrutura química do alginato; a) resíduos de ácidos manurônicos; b) resíduos de ácidos gulurônicos; c) resíduos de ácidos manurônicos e gulurônicos alternados.
 Fonte: KAWAGUTI e SATO, 2008

O alginato de sódio, solúvel em água, apresenta a propriedade de formação de gel na presença de cátions multivalentes como os íons Ca^{2+} . Esferas de alginato podem ser preparadas através da extrusão da solução de alginato, contendo a proteína ou célula de interesse, por gotejamento em soluções de Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} . A formação do gel e pontes cruzadas dos polímeros é possível devido à troca dos íons de sódio por cátions divalentes, demonstrado na Figura 6, esta estrutura gelificada também é conhecida como “Egg Box” (AMICI et al., 2008; KAWAGUTI e SATO, 2008).

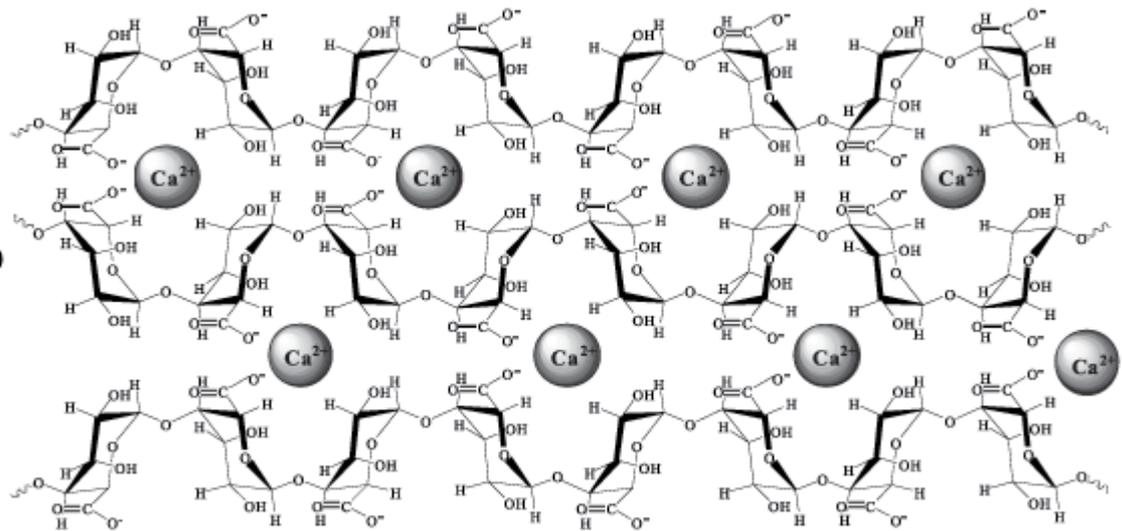


Figura 6: Estrutura química do gel de alginato formado através da ligação dos polímeros com o cálcio. Fonte: KAWAGUTI e SATO, 2008

Outro material bastante utilizado nos processos de imobilização celular é a quitosana. (NAYDENOVA et al., 2014). Essa é um amino-polissacarídeo derivado da quitina, cuja a qual, é um polissacarídeo de estrutura linear constituído por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variadas. A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina com tratamento alcalino e, portanto, é composta predominantemente por unidades D-glicosamina (Figura 7). A quitina é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos e insetos. A quitosana é insolúvel em água, bases, álcool e acetona, porém torna-se solúvel em soluções de alguns ácidos orgânicos como ácido acético em $\text{pH} < 6$ (JANEGITZ et al., 2007; MOURA, 2006; SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006).

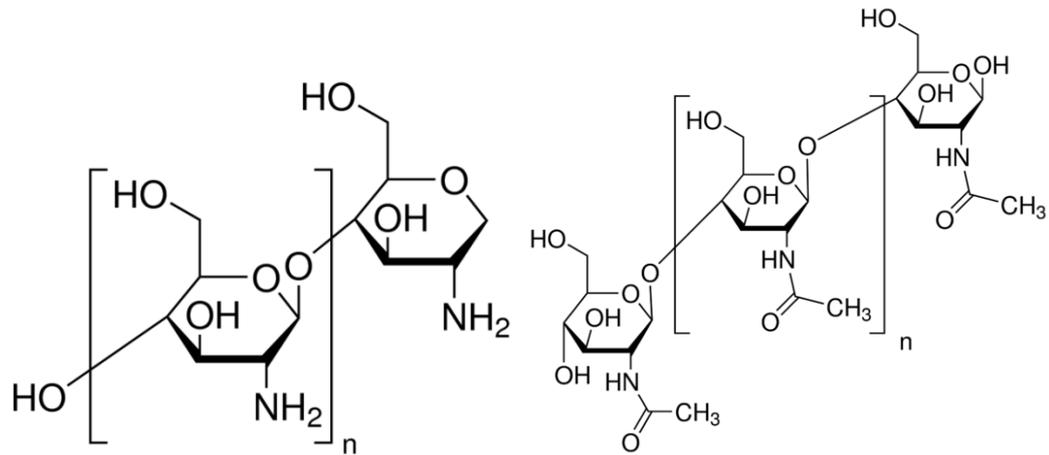


Figura 7: Estrutura química da quitosana e da quitina. Fonte: SIGMA ALDRICH, 2007

Quando um polímero aniônico como o alginato e um polímero catiônico como a quitosana estão presentes na solução aquosa, forma-se um Complexo Polieletrólito (PEC). Alginato e quitosana se ligam através da interação iônica entre os grupos amino da quitosana e grupos carboxila do alginato formando o PEC, que confere mais estabilidade e resistência aos dois polímeros diminuindo os poros das microesferas (ALBARGHOUTHY et al., 2000; BECHERÁN-MARÓN, PENICHE, ARGÜELLES-MONAL, 2004; GEORGE, ABRAHAM, 2006).

A literatura apresenta duas formas de se obter as microesferas de alginato com quitosana: a solução de alginato é gotejada numa solução de cloreto de cálcio e após o término desse processo as esferas são colocadas em contato com uma solução de quitosana em ácido acético e primeiramente a solução de alginato é misturada com a solução de quitosana em ácido acético que são gotejadas na solução de cloreto de cálcio (ALBARGHOUTHY et al., 2000; BECHERÁN-MARÓN, PENICHE, ARGÜELLES-MONAL, 2004; GEORGE, ABRAHAM, 2006).

Como proposta para aumentar a estabilidade de matrizes poliméricas como o alginato e a quitosana, o glutaraldeído é utilizado em diversos trabalhos com a função de realizar *cross-link* (ligação cruzada) entre as matrizes (RIEGGER et al., 2018). A Figura 8 apresenta a estrutura química do glutaraldeído. E a Figura 9 ilustra o *cross-link* entre quitosana e glutaraldeído ocasionado por uma hidrólise do glutaraldeído no grupamento amina da quitosana.

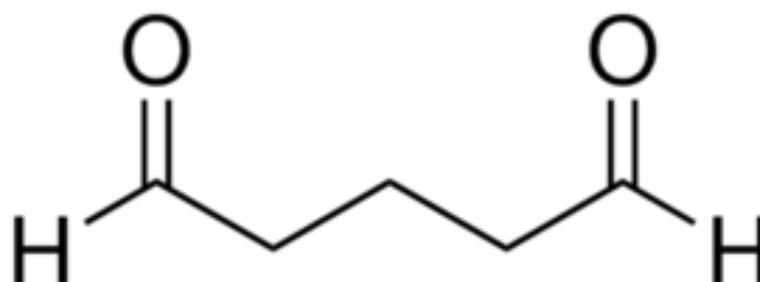


Figura 8: Estrutura química do glutaraldeído. Fonte: SIGMA ALDRICH, 2007

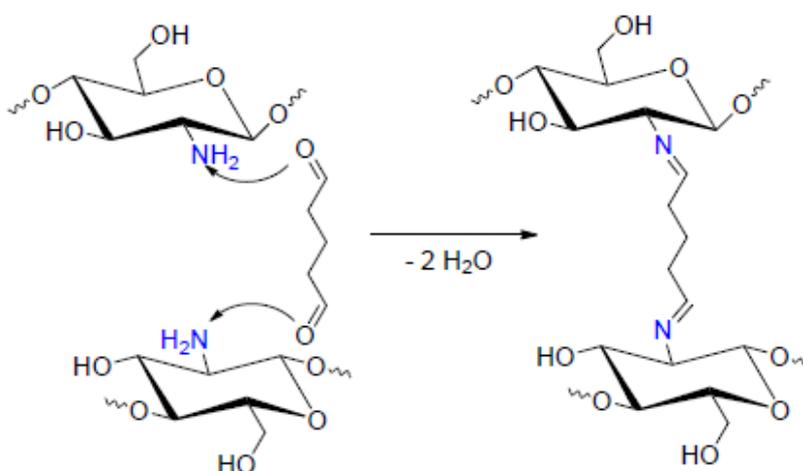


Figura 9: Cross-link entre quitosana e glutaraldeído. Fonte: COVIZZI et al.; 2007

Além da imobilização celular, uma nova alternativa no setor biotecnológico é o método de imantação por adsorção de partícula magnética na célula, enzima ou proteína de interesse, cuja proposta neste trabalho é de separar as leveduras imobilizadas. Nanopartículas magnéticas (NPM) feitas com óxido de ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}) já tem uso permitido pelo Food and Drug Administration (EUA) nas áreas de biotecnologia, que engloba a área alimentícia e produção de bebidas. Existem várias estratégias para efetuar a conjugação das NPM com biomoléculas, como por exemplo, o encapsulamento destas com polímeros como o alginato. Assim o uso de NPM no processo de fermentação alcoólica irá separar as leveduras da cerveja, resultando em eliminação da operação de remoção de células livres do produto (COLOMBO et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Atualmente o uso das NPM na medicina e biotecnologia vem sendo cada vez mais explorado na literatura (PETCHAROEN, SIRIVAT, 2012). Existem várias formas de óxidos de ferro, uma das mais utilizadas e sintetizadas é a Magnetita (Fe_3O_4). É conhecido que a

forma de preparação da NPM influencia nas suas características físico-químicas e magnéticas, o método mais simples e eficiente de preparação é pela co-precipitação química (SUPATTARASAKDA et al., 2013).

Pelo fato das NPM serem superparamagnéticas em ambiente natural, ou seja, apresentarem seu caráter magnético quando expostas a um campo magnético, estas partículas demonstram grande interesse de uso em diversas áreas de estudo (PETCHAROEN, SIRIVAT, 2012). Para obter esta característica as NPM precisam estar na escala nanométrica, e o modo em que as mesmas são sintetizadas influenciam no seu formato e tamanho. A síntese pela co-precipitação forma NPM em escala nanométrica e de morfologia esférica (LIU et al., 2006). O seu uso na biotecnologia e medicina vem sendo cada vez mais explorado pelas suas características magnéticas, biocompatibilidade e baixa toxicidade em organismos biológicos (PETCHAROEN, SIRIVAT, 2012). A separação de substâncias e partículas é um exemplo de utilização das NPM, sendo uma tecnologia explorada neste trabalho em conjunto com a imobilização das leveduras em alginato para realizar a separação magnética das leveduras e da cerveja.

1.5.2. Adição de frutas como adjunto cervejeiro

Grande parte da produção cervejeira em território brasileiro é proveniente das grandes cervejarias que produzem cervejas tradicionais. Enquanto as microcervejarias são mais voltadas para a elaboração das chamadas cervejas artesanais, as microcervejarias brasileiras possuem média mensal de produção de cerveja de 4.160 litros (ABRABE, 2014). Para o público que está em busca de uma bebida de qualidade, com aroma e sabor mais pronunciado, as cervejas artesanais são uma alternativa (DONADINI & PORRETTA, 2017).

A cerveja contém quantidades significativas de vitaminas do complexo B, principalmente folatos e riboflavina, além de ser citada como importante fonte de selênio. A cerveja pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis encontrados tanto no malte quanto no lúpulo. Na composição da cerveja, cerca de 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% se originam do lúpulo (GANBAATAR et al., 2015; PIAZZON, FORTE, NARDINI, 2010; SIQUEIRA, BOLINI, MACEDO, 2008).

A cerveja é uma bebida que possui capacidade antioxidante moderada, devido à presença de compostos fenólicos. A capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, porém inferior à do vinho tinto (SIQUEIRA, BOLINI, MACEDO, 2008).

Segundo estudo realizado por GORINSTEIN ET AL. (2000) a concentração de procianidinas, epicatequinas e ácido ferúlico é significativamente maior na cerveja quando comparada ao vinho branco, conferindo à cerveja boa capacidade antioxidante.

Entre os antioxidantes consumidos nos alimentos, os compostos fenólicos costumam ser os mais abundantes nas dietas. Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo e consequentemente o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis. Estudos epidemiológicos sugerem associações entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a prevenção de muitas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (HAMINIUK et al., 2012).

Além dos antioxidantes fenólicos atuarem como sequestradores de radicais livres, algumas vezes também atuam como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica (HAMINIUK et al., 2011). Devido à sua capacidade antioxidante e baixo teor alcoólico, o consumo moderado de cerveja é considerado benéfico à saúde (CALLEMIEN & COLLIN, 2009; SIQUEIRA, BOLINI, MACEDO, 2008).

A legislação brasileira permite que parte do malte de cevada possa ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a 45% em relação ao malte de cevada (BRASIL, 2009). Visando basicamente a redução de custos com a matéria-prima, as indústrias cervejeiras substituem parte do malte de cevada por outros cereais como o griz de milho, o arroz partido, o trigo, a própria cevada não malteada e o xarope de milho. Os adjuntos derivados de cereais são definidos como fonte de carboidratos não malteados. Esses adjuntos são adicionados na fase de mosturação e as enzimas contidas no malte hidrolisam parte do seu amido a açúcares fermentáveis (RIO, 2013; CARVALHO, 2007).

As frutas são um dos adjuntos possíveis de se utilizar na produção de cerveja artesanal. Frutos têm sido utilizados como adjuntos cervejeiros há séculos, especialmente no estilo belga Lambic (Fruits Lambics). A adição de frutas como cereja, framboesa e pêssego são comuns para este estilo de cerveja (PRASAD, 2014). A adição de frutas tropicais como adjunto cervejeiro pode fornecer um produto inovador e as frutas também são uma alternativa em fonte de açúcares para as leveduras realizarem a fermentação alcoólica.

O sapoti (*Manilkara sapota* L.) é nativo da América Central e pertence à família *Sapotaceae* (Figura 10). Apesar de esta planta ter se adaptado às mais diferentes condições de

solo, clima e altitude nos trópicos, seu desenvolvimento e produção são favorecidos por altas temperaturas e umidade. Assim, no Brasil, os estados nordestinos se destacam na produção de sapoti. Um grande incentivo para os produtores é o elevado preço que este fruto atinge no mercado interno (MORAIS et al., 2006). Nos vários países onde o sapoti é produzido, o mesmo é consumido na maioria das vezes *in natura*. O sapoti é um fruto suculento, bastante doce e seu aroma pode ser identificado com facilidade. Na caracterização da polpa de sapoti *in natura*, a média de sólidos solúveis totais foi de 15,67°Brix o teor de açúcares foi de 11,17% (OLIVEIRA, AFONSO, COSTA, 2011).



Figura 10: Fotos do sapoti (*Manilkara sapota* L.). Fonte: próprio autor

A atemoia (*Annona squamosa* x *Annona cherimola*) é um híbrido interespecífico entre a cherimoia (*Annona cherimola* Mill) e a ata, pinha ou fruta do conde (*Annona squamosa* L.) e pertence à família *Annonaceae*, sendo oriunda da América do Sul (Figura 11). A atemoia é cultivada principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Os frutos apresentam alto valor comercial nos mercados nacional e internacional. Esta fruta vem tendo nos últimos anos uma preferência especial pelos consumidores e produtores por apresentar algumas vantagens em relação à ata. Entre as vantagens, o fruto apresenta menor número de sementes, maior rendimento em polpa e sabor delicado (SILVA et al, 2009; SOBRINHO, 2010). No estudo de ORSI et al. (2012), na caracterização da polpa de atemoia *in natura*, a média de sólidos solúveis totais foi de 25,10°Brix o teor de açúcares foi de 21,93%.

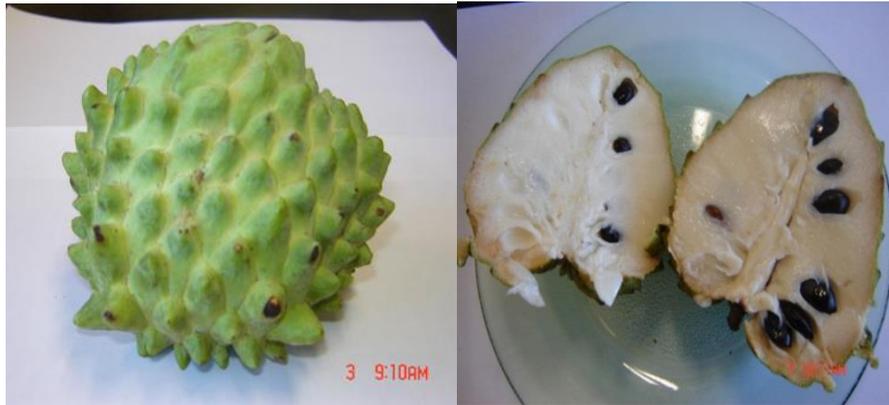


Figura 11: Fotos da atemoia (*Annona squamosa* x *Annona cherimola*). Fonte: próprio autor

Muitas frutas tropicais, como o sapoti e a atemoia são considerados frutos exóticos e apresentam grande potencial para industrialização. Esses frutos são populares nas regiões tropicais e muito apreciados por seu sabor. Contudo, tais frutos apresentam alta perecibilidade e perdas pós-colheita, tendo um rápido amadurecimento, o que dificulta sua conservação e comercialização. O uso de tecnologia de processamento pode ser uma solução para aproveitar o excedente da produção destes frutos, que na maioria das vezes são consumidos somente *in natura*. A polpa congelada, o suco e o sorvete são os produtos geralmente produzidos a partir das frutas tropicais. O desenvolvimento de outros produtos como as cervejas com frutas deve agregar valor a esses frutos e como desafio deve-se levar em consideração que muitas vezes o processamento leva a perda do sabor característico da fruta (OLIVEIRA, AFONSO, COSTA, 2011; ORSI et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esse estudo teve como objetivo principal a produção de cervejas artesanais no estilo Pilsen, formuladas com adição das frutas tropicais sapoti e atemoia em sua composição e a utilização de leveduras imobilizadas em micropartículas magneto poliméricas para avaliação dos processos de fermentação alcoólica.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver as cervejas artesanais no estilo Pilsen utilizando as polpas de sapoti e atemoia como adjuntos cervejeiros;
- Realizar análises físico-químicas nos mostos e cervejas;
- Avaliar a atividade fermentativa das leveduras imobilizadas em alginato em comparação com leveduras livres durante a fermentação alcoólica;
- Avaliar o reuso das leveduras imobilizadas em alginato durante as fermentações alcoólicas;
- Realizar a produção de cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas em alginato;
- Desenvolver um conjugado das NPM com as leveduras imobilizadas e aplicar esse sistema imobilizado na etapa de fermentação alcoólica.

3. METODOLOGIA

3.1. Matérias primas utilizadas na produção de cerveja

As matérias primas foram adquiridas do fornecedor Brew Market, São Paulo, SP. A levedura comercial utilizada foi a alemã Lager W 34/70 Fermentis®. O malte utilizado foi o tipo Pilsen Best Malz importado da Alemanha, sendo que os grãos foram adquiridos inteiros e a moagem foi feita no laboratório. O lúpulo utilizado foi o de aroma SAAZER adquirido em pellets e importado da República Tcheca.

3.2. Brassagem (mosturação e fervura do mosto)

Durante o processo de brassagem, pesaram-se 2,3 Kg de malte moído e utilizaram-se 6 litros de água mineral no processo. Mais 4 litros de água foram separados para as etapas posteriores de lavagem e fervura do mosto. Em uma panela grande com torneira embutida foram aquecidos 6 litros de água mineral. A temperatura foi controlada até atingir 65°C e adicionou-se o malte triturado dentro de uma bolsa para cozimento e coagem de grãos. A temperatura foi mantida na faixa de 65 até 75°C, durante 1 hora. Durante a operação de

mosturação, ocorreu o processo enzimático de sacarificação, onde o amido contido no malte em maltose e outros açúcares, conforme ilustrado na Figura 12.



Figura 12: Mosturação do malte realizada durante o processo de fabricação da cerveja artesanal. Fonte: próprio autor

Na etapa seguinte fez-se a recirculação do mosto. Essa etapa do mosto consistiu em lavar o bolo de grãos de malte com o próprio mosto, a fim de se retirar o máximo de açúcares do meio dos grãos. Para execução desta etapa, abriu-se a torneira da panela e encheu-se um béquer com 1 litro com o mosto. Em seguida, verteu-se o mosto sobre os grãos de malte usando uma escumadeira. O processo de recirculação foi repetido por 20 vezes.

Após a etapa de recirculação do mosto, procedeu-se a etapa de lavagem do bagaço de malte. Para execução desta etapa, abriu-se a torneira da panela e recolheu-se a maior parte do mosto, até que os grãos de malte começaram a aparecer dentro da panela. A partir deste ponto, iniciou-se o processo de lavagem do bagaço de malte usando 4 litros da água previamente separada para lavagem. A lavagem tem a função de extrair o máximo de açúcares que ainda possam estar presentes no bagaço de malte.

Após a etapa de lavagem, o bagaço do malte foi descartado e o mosto foi recolocado dentro da panela para a etapa seguinte de fervura do mosto. O mosto foi fervido por 1 hora e durante a fervura realizou-se as adições de lúpulo em três tempos diferentes. O lúpulo de 1ª Adição/Amargor (20 g) foi adicionado no início da fervura; o lúpulo de 2ª Adição/Odor (10 g) foi adicionado após 45 minutos do início da fervura e o lúpulo de 3ª Adição/Odor (10 g) foi adicionado após 57 minutos do início da fervura.

Após a etapa de fervura do mosto, foi realizada a correção do volume final do mosto com adição de água e com auxílio de um refratômetro de bancada. O teor de sólidos solúveis do mosto encontrou-se elevado após a etapa de fervura devido à evaporação de parte da água, então se fez necessário à adição de água para diluição do mosto até atingir o teor de sólidos

solúveis adequado para o processo de fermentação, aumentando o rendimento de cerveja produzida ao final. Para este trabalho foram utilizados mostos com 12 a 15° Brix.

O resfriamento do mosto até a temperatura de 18°C foi realizado com auxílio de um trocador de calor de alumínio. O mosto resfriado foi filtrado com uma peneira de aço inox para eliminar resíduos de cascas de bagaço de malte e de lúpulo e então se fez adição das polpas das frutas.

3.3. Adição das polpas de sapoti e atemoia no mosto cervejeiro

Os frutos sapoti e atemoia foram adquiridos na Central de Abastecimento (CEASA, Brasília, DF), no período de Julho a Setembro de 2016. No laboratório, os frutos foram sanitizados em solução contendo hipoclorito de sódio e lavados em água corrente antes do uso. Os frutos foram despulpados e as sementes foram descartadas. A polpa de atemoia foi adicionada no mosto cervejeiro na concentração de 8,5% (p/v) e a polpa de sapoti foi adicionada no mosto cervejeiro na concentração de 17% (p/v). A polpa de atemoia apresentou 20°Brix e a polpa de sapoti apresentou 21°Brix.

3.4. Fermentação

Aproximadamente 30 minutos antes de se iniciar o processo de fermentação, foi realizada a ativação da levedura seca. Para isso, encheu-se um béquer com 500 mL de mosto e pesou-se 6 g de levedura seca. A levedura foi adicionada ao mosto e foi bem homogeneizada. O processo foi realizado em capela de fluxo laminar para evitar contaminação. Para o processo de fermentação, o mosto foi introduzido em garrafas plásticas de 5 litros (Figura 13). Adicionou-se o fermento (levedura ativada) nos fermentadores, agitando-os levemente para a areação da mistura. Em seguida confeccionou-se um “Airlock” com mangueira para cada fermentador, de modo a permitir a saída de CO₂ e impedir a entrada de oxigênio durante a fermentação alcoólica, evitando assim, contaminação microbiana externa. Os fermentadores foram incubados em câmara climática a 15°C por 15 dias.



Figura 13: Fermentadores de 5 litros utilizados no processo de fabricação da cerveja artesanal. Fonte: próprio autor

3.5. Maturação

Os fermentadores foram retirados da câmara climática após 15 dias de fermentação alcoólica e a cerveja verde foi transferida com auxílio de uma bomba de vácuo para garrafas previamente higienizadas. No fim do processo de fermentação alcoólica, as leveduras e o bagaço de atemoia ou sapoti se sedimentaram ao fundo do fermentador e na trasfega esse sedimento foi eliminado. Para o processo de maturação foi determinado que as cervejas verdes fossem colocadas em refrigerador a 5°C por 15 dias.

3.6. Carbonatação e engarrafamento

Após 15 dias de maturação, as garrafas foram retiradas do refrigerador. Para o processo de carbonatação, foi efetuado a carbonatação, com adição de 7 g de xarope de glicose e uma suspensão de leveduras para cada 500 mL de cerveja. Para o preparo da suspensão de leveduras, pesou-se 0,5 g de levedura seca em 30 mL de água. As cervejas foram engarrafadas em garrafas de vidro âmbar de 600 mL e lacradas com recravadora comum. Depois de lacradas e armazenadas, as garrafas foram deixadas a temperatura ambiente por 15 dias para formação de gás carbônico.

3.7. Análises físico-químicas

O pH foi determinado em pHmetro digital (AOAC, 2006). A acidez total foi determinada através da titulação com NaOH 0,1 M padronizado (IAL, 1985). O teor de sólidos solúveis (graus Brix) foi determinado por refratômetro de bancada a 20°C. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ADNS ou ácido 3-5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959). Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912). A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (KIM et al., 2002) e ABTS (RE et al., 1999). O grau alcoólico das cervejas determinou-se com uso de alcoômetro de Gay-Lussac (°GL) colocado diretamente em volume de 250 mL de destilado a 20°C (IAL, 1985). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média e desvio padrão.

3.8. Imobilização das leveduras em alginato

Para realizar o processo de imobilização, uma suspensão de leveduras 1% (p/v) foi misturada com uma solução de alginato de sódio 4% (p/v) (Dinâmica®), previamente esterilizada. A contagem de células nessa suspensão de leveduras foi realizada em câmara de Neubauer e apresentou a concentração de 10^8 células/mL. As soluções de alginato 4% e levedura 1% foram misturadas em proporções de volume iguais (1:1) e o alginato nessa solução obteve a concentração de 2%. A mistura resultante foi gotejada por meio de uma ponteira acoplada em uma bomba peristáltica em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% (p/v) previamente esterilizada, para a formação de esferas. As esferas imobilizadas foram mantidas por 12 horas no cloreto de cálcio na geladeira. Após 12 horas, as esferas foram retiradas do cloreto de cálcio e lavadas 20 vezes com água destilada para remover o excesso de cálcio. As esferas resultantes são demonstradas na Figura 14.



Figura 14: Leveduras imobilizadas em alginato de cálcio. Fonte: próprio autor

3.9. Avaliação da atividade de leveduras imobilizadas em alginato durante a fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, usando 30 g de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio 2% (p/v) e 100 mL de mosto cervejeiro (13°Brix e 6,53% de açúcares redutores). Para realizar um estudo comparativo, também foi realizado um ensaio com leveduras livres. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura de 15°C. Para avaliar o processo de fermentação alcoólica, alíquotas de mosto fermentado foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 144 horas. As alíquotas foram analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis (graus Brix), pH e açúcares redutores.

3.10. Reuso das leveduras imobilizadas

No estudo do reuso das leveduras imobilizadas, a fermentação alcoólica foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, usando 30 g de leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto cervejeiro (13°Brix e 6,53% de açúcares redutores). O ensaio foi realizado em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura de 15°C. Após 72 horas de incubação, as esferas foram filtradas, lavadas com água destilada e adicionou-se mosto fresco para uma nova etapa de fermentação alcoólica. Foram realizados 5 reusos. Após cada reuso,

as esferas foram pesadas e o fermentado alcoólico foi analisado quanto ao teor de sólidos solúveis (graus Brix) e açúcares redutores.

3.11. Estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas no processo de fermentação alcóolica

Para o estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas no processo de fermentação alcóolica, foram realizados experimentos em erlenmeyers de 1000 mL com 300 mL de mosto cervejeiro (13°Brix e 7,69% de açúcares redutores). Foram testadas as concentrações de 5, 10 e 16,5 % (p/v) de leveduras imobilizadas, ou seja, para a concentração de 10% de leveduras imobilizadas pesou-se 10 g de esferas de leveduras imobilizadas em alginato para cada 100 mL de mosto cervejeiro. Nos intervalos de 24, 48 e 96 horas foram retiradas alíquotas de fermentado alcoólico para análises do teor de sólidos solúveis (graus Brix). Após 96 horas de fermentação, os fermentados alcoólicos foram analisados quanto ao grau alcoólico (°GL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.12. Planejamento experimental para estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas e da concentração de alginato no processo de fermentação alcóolica

Foi utilizado planejamento composto central 2^2 para estudar a influência das variáveis: concentração de leveduras imobilizadas (3,3-20,0 %, p/v) e concentração de alginato (0,5-5,0 %, p/v) no processo de fermentação alcóolica. Os ensaios totalizaram 12 experimentos, incluindo quatro ensaios referentes ao fatorial 2^2 (-1 e +1), quatro repetições no ponto central (0) e quatro ensaios nos pontos axiais ($\alpha = 1,42$), gerando após validação estatística, o diagrama de Pareto. A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional STATISTICA, versão 10.0. Essa análise incluiu o teste Fisher (teste F) (RODRIGUES e LEMMA, 2014). A Tabela 1 mostra as variáveis independentes e os valores decodificados do planejamento experimental.

Tabela 1: Valores decodificados utilizados no planejamento experimental

Variáveis	-α	-1	0	1	α
Concentração de leveduras imobilizadas (%)	3,3	5,3	10,0	17,0	20,0
Concentração de alginato (%)	0,5	1,0	2,0	4,0	5,0

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 1000 mL com 300 mL de mosto cervejeiro (13°Brix e 7,69% de açúcares redutores) e após 48 horas de fermentação foram retiradas alíquotas de fermentado alcoólico para determinação do teor de sólidos solúveis (graus Brix).

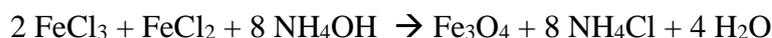
3.13. Produção de cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas em alginato e estudo do efeito do sistema imobilizado na fermentação alcoólica

A produção de cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas foi realizada utilizando a concentração de leveduras 10 % (p/v) imobilizadas em alginato 2 % (p/v). O processo de brassagem foi realizado conforme o item 3.2. O mosto foi dividido em duas garrafas de fermentação. Após adição de leveduras imobilizadas, os fermentadores foram incubados em câmara climática a 15°C por 15 dias. Em um fermentador, a cada 24 horas durante 15 dias, foram retiradas alíquotas de mosto fermentado para analisar o efeito do sistema imobilizado na fermentação alcoólica. As alíquotas foram analisadas em relação ao pH, acidez total, teor de sólidos solúveis (graus Brix), açúcares redutores e grau alcoólico (°GL). O outro fermentador, após 15 dias de fermentação alcoólica, foi retirado da câmara climática e a cerveja verde foi trasfegada para uma garrafa previamente higienizada e nesse processo as leveduras imobilizadas foram eliminadas. Para a maturação, a cerveja foi incubada a 5°C por 15 dias. A cerveja foi engarrafada conforme o item 3.6 e deixada à temperatura ambiente por 15 dias para formação de gás carbônico.

3.14. Aplicação das leveduras imobilizadas com uso de nanopartículas magnéticas (NPM) na fermentação alcoólica

3.14.1 Produção das nanopartículas magnéticas (NPM)

As NPM foram sintetizadas por co-precipitação alcalina. A reação realizada foi a seguinte:



Primeiramente uma solução de Cloreto de Ferro III foi preparada na concentração de 0,5 mol/L. Esta primeira solução teve a adição de uma solução de Cloreto de Ferro II em uma concentração de 0,25 mol/L. As soluções de Ferro III + Ferro II foram agitadas continuamente e posteriormente foi adicionada uma solução de hidróxido de amônia na concentração de 2 mol/L, sob agitação magnética e aquecimento constante a 60°C por 60 minutos. Ao final da reação, utilizou-se um magneto para separar as NPM e estas foram lavadas com água destilada (processo foi repetido três vezes).

3.14.2. Imobilização das leveduras em matriz de alginato-NPM e aplicação na fermentação alcoólica

Para realizar o processo de imobilização, uma suspensão de leveduras 1% (p/v) foi misturada com uma solução de alginato de sódio 4% (p/v) (Dinâmica®), previamente esterilizada. A contagem de células nessa suspensão de leveduras foi realizada em câmara de Neubauer apresentou concentração de 10⁸ células/mL. As soluções de alginato e levedura foram misturadas em partes iguais (1:1) e o alginato nessa solução foi diluído para 2%. Então, a solução de nanopartículas magnéticas foi adicionada na mistura de leveduras e alginato. A mistura resultante foi gotejada em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% (p/v) previamente esterilizada, para a formação de esferas de 3,0 mm de diâmetro (Figura 15). As esferas imobilizadas foram mantidas por 12 horas no cloreto de cálcio na geladeira. Após 12 horas, as esferas foram retiradas do cloreto de cálcio e lavadas com água destilada para remover o excesso de cálcio e obtiveram-se as leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM.



Figura 15: Leveduras imobilizadas em matriz de alginato e nanopartículas magnéticas.
Fonte: próprio autor

A fermentação alcoólica foi realizada em erlenmeyer de 1000 mL, usando 30 g de leveduras imobilizadas em alginato-NPM e 300 mL de mosto cervejeiro (ou seja, concentração de leveduras de 10 %). Para realizar um estudo comparativo, também foi realizada a fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em alginato sem nanopartículas magnéticas. Os ensaios foram realizados em triplicata. O mosto cervejeiro utilizado na fermentação alcoólica apresentou 15°Brix e 9,24 % de açúcares redutores. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura de 15°C. Para avaliar o processo de fermentação alcoólica, alíquotas de mosto fermentado foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas e analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis (graus Brix). Após 96 h o mosto foi analisado quanto ao grau alcoólico (°GL) e as leveduras foram pesadas.

3.14.3. Imobilização das leveduras em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana e aplicação na fermentação alcoólica

Para realizar o processo de imobilização das leveduras, 0,25 g de leveduras, 2 mL de NPM, 2 g de alginato e 0,2 mL de glutaraldeído foram misturados em 100 mL de água

destilada estéril. A mistura resultante foi gotejada em uma solução aquosa de ácido acético 5% (p/v), conteúdo cloreto de cálcio 2% (p/v) e quitosana 0,2% (p/v). As esferas imobilizadas foram mantidas por 12 horas na solução de cloreto de cálcio com quitosana na geladeira. Após 12 horas, as esferas foram retiradas do cloreto de cálcio com quitosana e lavadas com água destilada e obtiveram-se as leveduras imobilizadas em matriz de alginato 2%, NPM 2%, glutaraldeído 0,2% e quitosana 0,2%.

O mosto utilizado como substrato para fermentação alcoólica foi composto por uma solução aquosa contendo peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e glicose 10% (p/v), conforme descrito por DUARTE et al. (2013). O mosto foi autoclavado a 121°C por 20 minutos antes do uso. O teor de sólidos solúveis dessa solução foi de 12° Brix. A fermentação alcoólica foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, usando 14 g de leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto.

Para realizar um estudo comparativo, também foi realizada uma fermentação alcoólica com leveduras livres. Os ensaios foram realizados em duplicata. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura de 15°C. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de mosto fermentado, por um período de 144 horas. As alíquotas foram analisadas em relação a teor de sólidos solúveis (graus Brix) por meio de um refratômetro de bancada e a concentração de ferro na solução.

A determinação da concentração de ferro no mosto foi realizada por leitura de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). A determinação do teor de ferro por ICP objetivou verificar a quantidade de nanopartículas de magnetita que havia no mosto de fermentação com esferas de alginato-quitosana-glutaraldeído-NPM. A leitura foi realizada por ICP-OES (Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado) num espectrômetro PerkinElmer, modelo Optima 8000, com potência do plasma 400 W, vazão do gás do plasma 10 L/min, vazão do gás auxiliar 0,2 L/min, nebulização 0,7 L/min, purga da óptica 5 mL/min (nitrogênio), injetor Alumina (2mm d.i.), Câmara de nebulização Scott, com processamento do sinal área sob o pico, tempo de integração automático, vazão de introdução da amostra 1,5 mL/min (COELHO, 2017). No preparo das amostras, 3 mL de todas as alíquotas foram diluídas com ácido nítrico 2% em um balão volumétrico de 25 mL. Antes da leitura todas as amostras foram diluídas em 1:100 (m/v).

3.14.4. Influência do uso do glutaraldeído e do uso da quitosana na fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em alginato-NPM

Para testar a influência do uso do glutaraldeído na fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em alginato-NPM, foram testadas as concentrações de glutaraldeído de 0,2% (p/v), 0,1% (p/v) e 0,05% (p/v). O glutaraldeído foi introduzido na mistura de alginato 2% (p/v), leveduras 0,25% (p/v) e NPM 2% (p/v) e então essa mistura foi gotejada em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% (p/v) para a formação das esferas de 3,0 mm de diâmetro. As esferas imobilizadas foram mantidas por 12 horas na solução de cloreto de cálcio na geladeira. Após 12 horas, as esferas foram retiradas do cloreto de cálcio, lavadas com água destilada e assim obtiveram-se as leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído nas concentrações de 0,2% (p/v), 0,1% (p/v) e 0,05% (p/v).

E para testar a influência do uso da quitosana na fermentação alcoólica das leveduras imobilizadas em alginato-NPM, foram testadas as concentrações de quitosana de 0,1 e 0,05 % (p/v). A mistura de alginato 2% (p/v), leveduras 0,25% (p/v) e NPM 2% (p/v) foi gotejada em uma solução aquosa de ácido acético 5 % (p/v), conteúdo cloreto de cálcio 2% (p/v) e quitosana para a formação das esferas de 3,0 mm de diâmetro. As esferas imobilizadas foram mantidas por 12 horas na solução de cloreto de cálcio com quitosana na geladeira. Após 12 horas, as esferas foram retiradas do cloreto de cálcio com quitosana e lavadas com água destilada e assim obtiveram-se as leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-quitosana nas concentrações de 0,1% (p/v) e 0,05% (p/v).

O mosto utilizado como substrato para fermentação alcoólica foi composto por uma solução aquosa conteúdo peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e glicose 10% (p/v), conforme descrito por DUARTE et al. (2013). O mosto foi autoclavado a 121°C por 20 minutos antes do uso. O teor de sólidos solúveis dessa solução foi de 12°Brix. A fermentação alcoólica foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, usando 14 g de leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura de 15°C.

Para avaliar o processo de fermentação alcoólica, alíquotas de mosto fermentado foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas e analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis (graus Brix). Foram realizados os seguintes ensaios: 1) leveduras livres, 2) leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM, 3) leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM e uso do glutaraldeído nas concentrações de 0,2% (p/v), 0,1% (p/v) e 0,05% (p/v) e 4)

leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM e uso da quitosana nas concentrações de 0,1 e 0,05 % (p/v).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises físico-químicas dos mostos e das cervejas sem adição de frutas, com polpa de atemoia e com polpa de sapoti

Para a produção das três cervejas: cerveja sem adição de frutas, cerveja com polpa de atemoia e cerveja com polpa de sapoti, obteve-se 6-7 litros dos mostos cervejeiros com o teor de sólidos solúveis entre 14,7-15,0°Brix.

Os mostos utilizados na produção das cervejas sem adição de frutas, com polpa de atemoia e com polpa de sapoti apresentaram entre 14,77 a 15,00°Brix e 7,51 a 7,88% de açúcares redutores (açúcares fermentescíveis como maltose e glicose). No estudo de BONCIU, STOICESCU (2008), o mosto utilizado na produção da cerveja com adição de cerejas apresentou 13,26°Brix e no estudo de estudo de CARVALHO ET AL. (2009), o mosto utilizado na produção da cerveja com adição de bananas apresentou 12,00°Brix. De acordo BRIGGS ET AL. (2004), o mosto de malte de cevada apresenta 47% de maltose, 14% de maltotriose, 8% de glicose (açúcares fermentescíveis) e 30,5% de dextrinas (açúcares não fermentescíveis).

A acidez dos mostos deste estudo variou de 0,20-0,22 % e o pH variou de 5,51-5,85 . No estudo de BRUNELLI, MANSANO, VENTURINI FILHO (2014) foi reportado resultado parecido, onde o mosto cervejeiro apresentou valor médio de acidez de 0,15 % e pH de 5,83. De acordo com FLORES ET AL. (2015), o pH do mosto cervejeiro deve situar-se entre 5,0 e 6,0, ocorrendo acidificação no processo posterior de fermentação alcoólica. E de acordo com PEREIRA, LEITÃO (2016), a acidez total do mosto cervejeiro deve encontrar-se entre 0,1 e 0,3 % de ácido láctico.

Os teores de compostos fenólicos dos mostos desse estudo variaram de 77,26-80,34 mg/100mL. No estudo de Barbosa (2016) o mosto utilizado na produção da cerveja com polpa de maracujá apresentou 99,00 mg/100mL de compostos fenólicos. Segundo ARON, SHELLHAMMER (2010), no mosto cervejeiro cerca de 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% se originam do lúpulo.

A Tabela 2 apresenta as análises físico-químicas das cervejas sem adição de frutas, com polpa de atemoia e com polpa de sapoti. Após a fermentação alcoólica, obteve-se 4,0 litros das cervejas com o teor alcoólico entre 4,6-5,0°GL.

Tabela 2: Análises físico-químicas das cervejas sem adição de frutas, com polpa de atemoia e com polpa de sapoti

Análises	Cerveja sem frutas	Cerveja de atemoia	Cerveja de sapoti	Valor de p
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,34 ± 0,01a	0,32 ± 0,01b	0,28 ± 0,01c	0,0009
pH	4,16 ± 0,01a	4,23 ± 0,01b	4,51 ± 0,03c	<0,0001
Sólidos solúveis (°Brix)	8,00 ± 0,01a	6,00 ± 0,01b	6,06 ± 0,15b	<0,0001
Açúcares redutores (%)	1,94 ± 0,07a	1,14 ± 0,03b	1,28 ± 0,14b	0,0072
Fenólicos totais (mg/100 mL)	64,00 ± 0,15a	111,29 ± 0,03b	77,61 ± 0,05c	0,0014
Teor alcoólico (°GL)	4,60 ± 0,28a	5,00 ± 0,07b	5,00 ± 0,01b	0,0028

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey

O teor de acidez da cerveja no estilo Pilsen (sem adição de frutas) deste estudo foi de 0,34 % e o pH foi de 4,16. Segundo BRIGGS ET AL. (2004), nas cervejas Pilsen puro malte o pH varia entre 3,74 a 4,63. No estudo de PINTO, ZAMBELLI, PONTES (2015) as cervejas elaboradas com diferentes teores de acerola e abacaxi apresentaram acidez de 0,38 a 0,49 % e pH de 4,10 a 4,24. Não existe um valor padrão para acidez total em cervejas (TAYLOR, 2015) e na legislação brasileira não existe um limite para uma acidez ou pH máximos permitidos para cervejas. A produção de ácidos orgânicos durante a fermentação alcoólica é responsável pela queda de pH observada entre o mosto e a cerveja (DRAGONE et al., 2008).

Neste estudo a adição das polpas de atemoia e sapoti não aumentou a acidez das cervejas de atemoia (0,32 %) e de sapoti (0,28 %) em relação à cerveja sem frutas (0,34 %), pois tanto a atemoia quanto o sapoti são frutas pouco ácidas. No estudo de ORSI ET AL. (2012) a polpa de atemoia *in natura* apresentou acidez de 0,54% e no estudo de OLIVEIRA, AFONSO, COSTA (2011) a polpa de sapoti *in natura* apresentou acidez de 0,08%. No entanto, é comum observar um aumento da acidez com a adição de polpas de frutas nas cervejas de frutas. No estudo de TRINDADE (2016) as cervejas tiveram valores de acidez aumentados com a adição de maior quantidade polpa de amora e a polpa de amora *in natura* apresentou acidez de 1,56 %.

As cervejas no estilo Pilsen geralmente apresentam teor alcoólico entre 3,0 e 5,0°GL (HORNSEY, 2003). O teor alcoólico obtido para as cervejas deste estudo foi de 4,6°GL para a cerveja sem frutas e 5,0°GL para as cervejas de atemoia e de sapoti. Resultados parecidos foram obtidos no estudo de BONCIU, STOICESCU (2008), onde a cerveja com cerejas apresentou teor alcoólico de 4,9°GL. No estudo de CARVALHO ET AL. (2009) a cerveja elaborada com banana apresentou teor alcoólico de 5,3°GL, enquanto a cerveja sem frutas apresentou menor teor alcoólico de 4,7°GL. A adição de polpas de frutas com altos teores de açúcares como a banana, o sapoti e a atemoia contribuíram com aumento dos teores alcoólicos das cervejas de frutas.

O teor de compostos fenólicos totais da cerveja no estilo Pilsen (sem adição de frutas) deste estudo foi de 64 mg/100mL. FREITAS ET AL. (2006) reportaram valores de compostos fenólicos de 40 a 80 mg/100mL para diferentes tipos de cerveja (cervejas de trigo clara e escura, cervejas de cevada clara e escura de diferentes marcas). No estudo de GANBAATAR ET AL. (2015), a análise de identificação de compostos fenólicos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência identificou maiores concentrações de catequina e ácido gálico e menores concentrações de ácido ferúlico, rutina, ácido vanílico e ácido p-cumárico em todas as amostras de cervejas no estilo Pilsen analisadas. No estudo de PIAZZON, FORTE, NARDINI (2010), os diferentes estilos de cervejas analisadas apresentaram valores de compostos fenólicos de 48 mg/100mL (Pilsen) a 87 mg/100mL (Bock). Na análise de identificação de compostos fenólicos, em todas as cervejas o ácido ferúlico foi o composto fenólico encontrado em maior quantidade.

Neste estudo a adição das polpas de frutas aumentou o teor de compostos fenólicos totais das cervejas de atemoia (111,29 mg/100 mL) e de sapoti (77,61 mg/100 mL) em relação à cerveja sem frutas (64,00 mg/100 mL). É comum observar um aumento do teor de compostos fenólicos totais com a adição de polpas de frutas nas cervejas de frutas, pois a maioria das frutas é rica em compostos fenólicos (HAMINIUK et al., 2012; HAMINIUK et al., 2011). No estudo de TRINDADE (2016), as cervejas tiveram os compostos fenólicos aumentados com a adição de maior quantidade polpa de amora, apresentando valores de 480,5 e 632,1 mg/100 mL, nas cervejas com adição de 10 e 30% de polpa de amora, respectivamente. No estudo de VOGEL (2017), a adição da polpa de mirtilo aumentou a concentração de polifenóis da cerveja com mirtilos (95,0 mg /100 mL) em relação a cerveja Pilsen (sem adição de frutas) que apresentou 73,4 mg /100 mL.

A tabela 3 apresenta os resultados da atividade antioxidante das cervejas sem adição de frutas e com polpa de atemoia. As atividades antioxidantes das cervejas desse estudo variaram de 1440 a 2334 μM TEAC para o método de ABTS e de 842 a 1159 μM TEAC para o método de DPPH.

Tabela 3: Atividade antioxidante das cervejas expressa como equivalente em trolox (TEAC), quantificada pelos métodos de ABTS e DPPH

Análises	Cerveja sem frutas	Cerveja de atemoia	Valor de p
ABTS (μM TEAC)	1440,58 \pm 39,42	2334,03 \pm 68,08	<0,001
DPPH (μM TEAC)	842,88 \pm 21,79	1159,39 \pm 18,16	0,004
Fenólicos totais (mg/100 mL)	64,00 \pm 0,15	111,29 \pm 0,03	0,026

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata \pm desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste *t de student*.

A adição de polpa de atemoia aumentou a atividade antioxidante da cerveja de atemoia em relação à cerveja sem frutas. TAFULO ET AL. (2010) apresentaram valores menores de atividade antioxidante para 27 amostras de cervejas comerciais, que variaram de 577 a 1189,5 μM TEAC para o método de ABTS e de 121,6 μM a 553,4 μM TEAC para o método de DPPH. FREITAS ET AL. (2006) reportaram valores de atividade antioxidante de 911 a 3857 μM TEAC para o método de ABTS para diferentes tipos de cerveja (cervejas de trigo clara e escura, cervejas de cevada clara e escura de diferentes marcas). Os autores relataram uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante medida pelos diferentes métodos (ABTS e DPPH) nos diferentes tipos de cerveja. Bebidas alcoólicas como o vinho e a cerveja mostram efeitos benéficos à saúde associados ao consumo moderado de álcool e de seus compostos fenólicos e atividade antioxidante (FREITAS et al., 2006; SANNA e PRETTI, 2015).

A Figura 16 apresenta as fotos das cervejas sem adição de frutas, com polpa de sapoti e com polpa de atemoia.

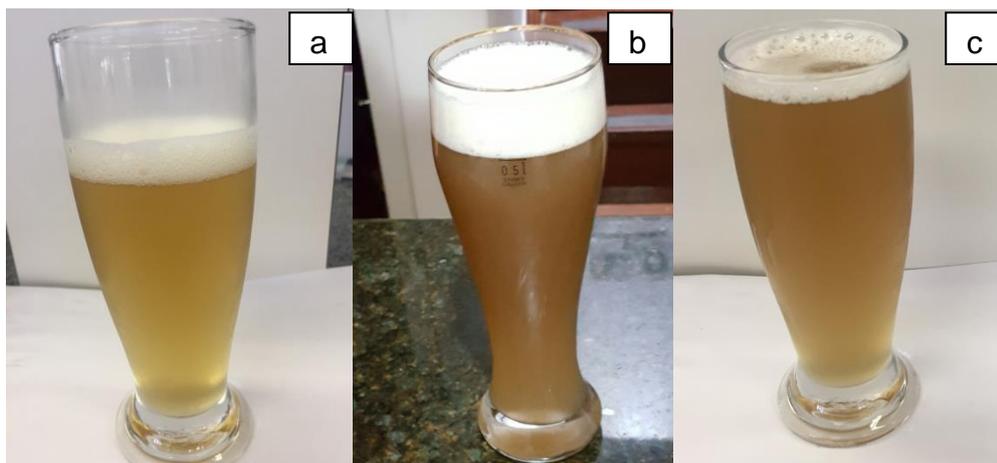


Figura 16: Fotos da: a) cerveja sem frutas b) cerveja de sapoti e c) cerveja de atemoia.
Fonte: próprio autor

A utilização de frutas na produção de cerveja garante uma doçura residual, aroma e sabor característico e aumenta o caráter vinoso à cerveja, conferindo-lhe uma maior variedade de compostos aromáticos (KUNZE, 2006). A utilização de frutas na formulação de cervejas permite a criação de novos estilos e esses estilos de cervejas com frutas vêm ganhando espaço no Brasil. As cervejas com frutas valorizam o uso das frutas regionais e também despertam a atenção dos consumidores.

4.2. Avaliação da atividade de leveduras imobilizadas em alginato durante a fermentação alcoólica

As fermentações alcoólicas foram realizadas usando 30 g de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio 2% (p/v) adicionadas em 100 mL de mosto cervejeiro. Para realizar um estudo comparativo, também foi preparado um ensaio com leveduras livres. A Tabela 4 apresenta as análises físico-químicas das alíquotas de mostos fermentados retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 144 horas de fermentação alcoólica.

Tabela 4: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas e por leveduras livres

Leveduras imobilizadas em alginato 2% (p/v)			
Tempo de Fermentação	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)
Mosto*	4,70 ± 0,09	13,00 ± 0,01	6,53 ± 0,18
24 h	3,65 ± 0,15	8,50 ± 0,56	3,10 ± 0,20
48 h	3,33 ± 0,01	6,93 ± 0,06	2,37 ± 0,03
72 h	3,36 ± 0,17	7,30 ± 0,00	2,31 ± 0,04
144 h	3,47 ± 0,03	7,30 ± 0,00	2,31 ± 0,08

Leveduras livres			
Tempo de Fermentação	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)
Mosto*	4,70 ± 0,09	13,00 ± 0,01	6,53 ± 0,18
24 h	3,87 ± 0,03	8,40 ± 0,03	4,14 ± 0,45
48 h	3,67 ± 0,01	8,60 ± 0,30	2,93 ± 0,09
72 h	3,73 ± 0,02	8,40 ± 0,17	2,72 ± 0,01
144 h	3,80 ± 0,01	8,60 ± 0,30	3,03 ± 0,01

*Mosto antes da inoculação de leveduras. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média e desvio padrão.

Ao se comparar os mostos fermentados por de leveduras imobilizadas e por leveduras livres, após 72 horas de fermentação, tanto para as leveduras imobilizadas quanto para as leveduras livres, a maior parte dos açúcares do mosto foi consumida (transformada em etanol). O mosto apresentou 13°Brix e 6,53% de açúcares redutores e os fermentados alcoólicos apresentaram 7,30-8,50°Brix e 2,03-3,03% de açúcares redutores. No tempo de fermentação de 144 horas não houve alteração dos resultados, indicando que a fermentação já tinha se completado em 72 horas.

Esses resultados podem ser comparados ao estudo de SMOGROVICOVA, DOMENY & SVITEL (2001), onde ao analisarem a atividade de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato, também se obteve finalização da fermentação alcoólica em 72 horas. No estudo de NAYDENOVA et al. (2014), as leveduras *Saccharomyces carlsbergensis* (Fermentis®) imobilizadas em uma matriz de alginato e quitosana também completaram a fermentação de cerveja Lager em 72 horas. E no estudo de ALMOCINAD et al. (2012) a velocidade de fermentação das leveduras imobilizadas foi igual a das leveduras livres e a fermentação principal das cervejas Stout ocorreu em 96 horas.

No estudo do reuso das leveduras imobilizadas, as fermentações alcoólicas foram realizadas usando 30 g de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio 2% (p/v) e 100 mL de mosto cervejeiro. Após 72 horas de incubação na temperatura de 15°C, as leveduras imobilizadas foram filtradas e adicionou-se mosto fresco para uma nova etapa de fermentação alcoólica. A Tabela 5 apresenta os resultados de cada reuso, sendo que após cada reuso, as leveduras imobilizadas foram pesadas e os fermentados alcoólicos foram analisados quanto ao teor de sólidos solúveis (graus Brix) e açúcares redutores.

Tabela 5: Análises físico-químicas dos fermentados alcoólicos após cada reuso e peso das leveduras imobilizadas

Variáveis	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)	Peso das leveduras imobilizadas (g)
Mosto*	13,00 ± 0,00	6,53 ± 0,18	30,00 ± 0,20
1º Uso	8,60 ± 0,00	2,99 ± 0,09	30,01 ± 0,45
2º Uso	8,30 ± 0,30	2,78 ± 0,02	33,91 ± 0,39
3º Uso	8,60 ± 0,30	2,87 ± 0,12	43,59 ± 0,27
4º Uso	8,40 ± 0,17	2,68 ± 0,01	49,96 ± 0,23
5º Uso	8,40 ± 0,35	1,68 ± 0,17	52,59 ± 0,38

*Mosto antes da inoculação de leveduras. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média e desvio padrão

O sistema imobilizado funcionou durante os cinco reusos e houve conversão do mosto açucarado em cerveja, observado através da diminuição dos açúcares e redução do teor de sólidos solúveis. Foi observado que o mosto apresentou 13°Brix e 6,53% de açúcares redutores e os fermentados alcoólicos resultantes dos reusos apresentaram 8,60-8,40°Brix e 2,99-1,68% de açúcares redutores. A maior alteração observada durante os reusos foi o peso das leveduras imobilizadas, que aumentou de 28,01 g no primeiro uso para 52,59 g no quinto reuso, evidenciando que as leveduras se multiplicaram no interior das esferas e que não houve ruptura da matriz do gel de alginato, pois a ruptura das esferas resultaria em perda de peso das leveduras imobilizadas, que escapariam para o meio de fermentação.

DUARTE et al. (2013), realizaram em seu trabalho 8 reusos de leveduras imobilizadas em alginato, em dois meios diferentes, um meio aquoso contendo glicose e outro meio aquoso contendo sacarose. Os autores descreveram, para ambos meios de cultivo, as vantagens do uso de células imobilizadas, como a reutilização celular e a produção equivalente de álcool em

todos os 8 reusos. Após o oitavo reuso, houve bastante ruptura das esferas (resultado da multiplicação das leveduras no interior das esferas que acabaram rompendo a estrutura do alginato) e os autores consideraram as esferas inapropriadas para continuar os ciclos de fermentações.

No estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas (5, 10 e 16,5 %, p/v) na fermentação alcoólica, as leveduras foram imobilizadas em alginato de cálcio 2% (p/v). O mosto utilizado nesse experimento apresentou 13°Brix e 7,69% de açúcares redutores. A Tabela 6 apresenta as análises físico-químicas das alíquotas de mostos fermentados com diferentes concentrações de leveduras retiradas nos tempos de 24, 48 e 96 horas de fermentação alcoólica.

Tabela 6: Influência da concentração de leveduras imobilizadas no processo de fermentação alcoólica

Concentração de leveduras imobilizadas (% p/v)	Sólidos solúveis (°Brix)			Teor alcoólico (%)
	24 h	48 h	96 h	96 h
	5,0	11,5 ± 0,70	7,7 ± 0,35	6,5 ± 0,77
10,0	9,5 ± 0,70	6,5 ± 0,70	6,0 ± 0,07	6,3 ± 0,10
16,5	8,6 ± 0,62	6,0 ± 0,01	6,0 ± 0,01	6,4 ± 0,01

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média ± desvio padrão.

Quando se usou a menor concentração de leveduras imobilizadas (5% p/v), foi possível observar um aumento do tempo necessário para fermentar todo o açúcar presente no mosto. Quando se utilizou 10 ou 16,5 % de leveduras imobilizadas, o aumento da carga de esferas resultou no aumento da velocidade de consumo de açúcares. Após 96 horas de fermentação os experimentos mostraram quantidades de 6,0-6,4 % de álcool.

A fermentação é um processo lento na fase inicial, pois as leveduras necessitam de um período de adaptação ao meio. Assim, nas primeiras 24 h de fermentação a carga de esferas estava proporcional à quantidade de leveduras presentes, porém com o decorrer da fermentação alcoólica ocorreu à multiplicação das leveduras no interior das esferas de alginato e assim após 96 h de fermentação houve o consumo do açúcar tanto do mosto

fermentado com a menor concentração de leveduras (5 %) quanto do mosto fermentado com 16,5 % de leveduras. Resultados semelhantes foram observados por NOGUEIRA (2009), onde a carga de biocatalisador (10, 15, 20, 25 e 32 % de leveduras imobilizadas em alginato) influenciou a velocidade de consumo dos açúcares presentes no mosto, sendo que o aumento da carga de leveduras imobilizadas resultou no aumento da velocidade de fermentação alcoólica.

4.3. Planejamento experimental para estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas e da concentração de alginato no processo de fermentação alcoólica

A Tabela 7 mostra o planejamento com os resultados observados (valores experimentais). No planejamento experimental, após 48 horas foram retiradas alíquotas de mostos fermentados para análises do teor de sólidos solúveis (°Brix). O mosto utilizado nesse experimento apresentou 13°Brix e 7,69% de açúcares redutores.

Tabela 7: Planejamento composto central 2², codificado e decodificado (valores reais entre parênteses)

Ensaio	Concentração de leveduras imobilizadas (%)	Concentração de alginato (%)	Valores experimentais Sólidos solúveis (°Brix) 48 horas	Sólidos solúveis (°Brix) 96 horas	Teor alcoólico (%) 96 horas
1	-1 (5,3)	-1 (1,0)	12,0	7,0	6,0
2	+1 (17,0)	-1 (1,0)	8,0	5,9	6,4
3	-1 (5,3)	+1 (4,0)	11,0	7,0	6,0
4	+1 (17,0)	+1 (4,0)	9,2	5,9	6,3
5	- α (3,3)	0 (2,0)	12,0	7,0	6,0
6	+ α (20,0)	0 (2,0)	7,0	5,9	6,3
7	0 (10,0)	- α (0,5)	9,0	5,9	6,3
8	0 (10,0)	+ α (5,0)	10,0	6,0	6,3
9	0 (10,0)	0 (2,0)	8,2	5,9	6,4
10	0 (10,0)	0 (2,0)	8,2	5,9	6,4
11	0 (10,0)	0 (2,0)	8,2	5,9	6,4
12	0 (10,0)	0 (2,0)	8,2	5,9	6,4

Por meio da análise de variância (ANOVA), comparando-se o valor do F calculado com o F tabelado (F_{tab}) é possível afirmar que o modelo proposto é válido a um nível de confiança de 90% ($p = 0,10$). A Tabela 8 apresenta os resultados da ANOVA, na qual o valor calculado de F (34,60) foi maior que o valor tabelado de F (4,05).

Tabela 8: ANOVA do planejamento experimental

Fonte	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F Calculado
Regressão	27,66	4	6,92	34,60
Erro Residual	0,99	5	0,20	
Total	28,65	10		

$F_{tab} 0,10;4;5 = 4,05$

Pelo diagrama de Pareto apresentado na Figura 17, analisando os parâmetros lineares, observou-se que a variável concentração de leveduras imobilizadas apresentou efeito significativo, sendo a variável com a maior influência sobre o teor de sólidos solúveis. A concentração de leveduras imobilizadas apresentou um efeito negativo sobre o teor de sólidos solúveis, ou seja, quanto maior a concentração de leveduras imobilizadas adicionada ao mosto maior foi à redução do teor de sólidos solúveis em 48 horas de fermentação. Já o parâmetro linear concentração de alginato não apresentou efeito significativo sobre o teor de sólidos solúveis, ou seja, o uso de alginato 0,5% ou alginato 5% não interferiu na fermentação alcoólica em 48 horas.

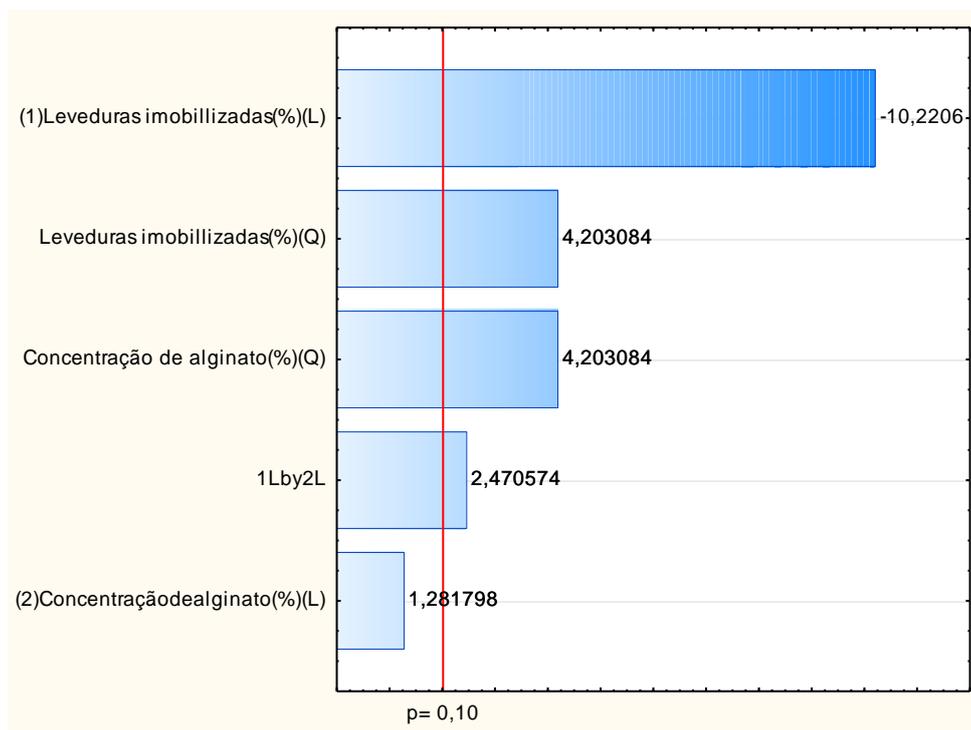


Figura 17: Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento experimental para estudo da influência da concentração de leveduras imobilizadas e da concentração de alginato no processo de fermentação alcoólica.

(L) = linear, (Q) = quadrático, 1L by 2 L = efeito da interação entre concentração de leveduras imobilizadas (L) e concentração de alginato (L).

O planejamento experimental mostrou que o parâmetro linear concentração de alginato (0,5-5,0 %, p/v) não teve influência significativa sobre o processo de fermentação alcoólica (Figura 17). OGBONNA, AMANO, NAKAMURA (1989) estudaram a influência da concentração de alginato (0,5-4,0%) na imobilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que as microesferas que apresentaram menos rupturas ao longo da fermentação alcoólica foram formuladas com alginato 1-2%. As esferas preparadas com alginato 0,5% ficaram menos rígidas e apresentaram rupturas após a fermentação alcoólica. E as esferas preparadas com alginato 4% mostraram limitação difusional imposta pela porosidade reduzida da matriz do gel.

Resultados similares foram observados por NAJAFPOUR ET AL. (2004), onde os autores testaram as concentrações de alginato de 1,5, 2, 3 e 6 % na imobilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e escolherem realizar a fermentação alcoólica usando a concentração de alginato 2%. Os autores descreveram que as esferas obtidas com alginato 1,5% ficaram moles e de fácil ruptura, enquanto as esferas elaboradas com alginato 6%

ficaram muito rígidas. Como consequência após o primeiro uso das leveduras imobilizadas em alginato 1,5%, as esferas apresentaram problemas de ruptura por excesso de crescimento das leveduras no interior da matriz, enquanto que nas leveduras imobilizadas em alginato 6% houve declínio da produção de etanol por provável difusão deficiente do mosto para o interior do sistema imobilizado. Os estudos descritos na literatura que usaram leveduras imobilizadas para produção de cerveja, usaram concentração de alginato entre 2 e 3% (ALMONACID et al., 2012, DUARTE et al., 2013; NAJAFPOUR et al., 2004; SMOGROVICOVA, DOMENY & SVITEL, 2001).

No planejamento experimental, a concentração de leveduras imobilizadas foi a variável linear que teve a maior influência sobre o teor de sólidos solúveis (Figura 17). A concentração de leveduras imobilizadas apresentou um efeito negativo significativo sobre o teor de sólidos solúveis, ou seja, quanto maior a concentração de leveduras adicionada ao mosto maior foi a redução do teor de sólidos solúveis em 48 horas de fermentação. No entanto, é preciso observar que só houve validação do modelo do planejamento experimental em 48 horas de fermentação alcoólica, quando a concentração de leveduras estava diferente entre os ensaios. Em 96 horas de fermentação, os ensaios apresentaram teor de sólidos solúveis de 5,9-7,0°Brix e teor alcoólico de 6,0-6,4%, evidenciando que no decorrer do tempo da fermentação as leveduras se multiplicaram no interior das esferas e consumiram os açúcares do mosto, produzindo etanol, não havendo diferença significativa entre os ensaios com a menor e a maior concentração de leveduras imobilizadas.

Os estudos de produção da cerveja com leveduras imobilizadas em alginato descritos na literatura usaram concentração de leveduras imobilizadas de 10% (DUARTE et al., 2013; SMOGROVICOVA, DOMENY & SVITEL, 2001). Baseado nos resultados dos estudos para avaliação da atividade de leveduras imobilizadas em alginato durante a fermentação alcoólica optou-se por fazer a cerveja no estilo Pilsen utilizando a concentração de leveduras 10 % (p/v) imobilizadas em alginato 2 % (p/v).

4.4. Produção de cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas em alginato e estudo do efeito do sistema imobilizado na fermentação alcoólica

A Tabela 9 apresenta os resultados das análises físico-químicas do mosto e da cerveja no estilo Pilsen produzida com o uso de 10 % (p/v) de leveduras imobilizadas em alginato 2

% (p/v). Foi obtido um rendimento de 7 litros de mosto com teor de sólidos solúveis de 14,08°Brix.

Tabela 9: Análises físico-químicas do mosto e da cerveja produzida com uso de leveduras imobilizadas em alginato

Análises	Mosto	Cerveja
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,19 ± 0,05	0,35 ± 0,05
pH	5,79 ± 0,05	4,43 ± 0,16
Sólidos solúveis (°Brix)	14,08 ± 0,16	5,27 ± 0,05
Açúcares redutores (%)	9,25 ± 0,05	2,18 ± 0,05
Teor alcoólico (°GL)	----	5,00 ± 0,05

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão.

A cerveja produzida com o uso de leveduras imobilizadas apresentou teor alcoólico de 5,0°GL, pH de 4,4 e 5,3°Brix. Resultados similares foram reportados no estudo de ALMOCINAD et al. (2012), onde a cerveja no estilo Stout produzida com leveduras imobilizadas em alginato 2% apresentou 4,8°GL, pH de 4,1 e 6,0°Brix.

A Tabela 10 e a Figura 18 apresentam as análises físico-químicas da cinética de fermentação da cerveja produzida com o uso de leveduras imobilizadas para analisar o efeito do sistema imobilizado na fermentação alcoólica. A cada 24 horas durante 15 dias, foram retiradas alíquotas de mosto fermentado do fermentador. As alíquotas foram analisadas em relação ao pH, acidez total, teor de sólidos solúveis (graus Brix), açúcares redutores e grau alcoólico (°GL). A fermentação alcoólica se completou em 6 dias, quando o teor de sólidos solúveis do mosto foi reduzido a 7,0°Brix e atingiu-se a graduação alcoólica de 4,9°GL. Após 15 dias de fermentação os valores não tiveram alteração significativa, apresentando a cerveja verde um teor alcoólico de 4,9°GL, 6,8°Brix e 2,2% de açúcares redutores.

Tabela 10: Análises físico-químicas da cinética de fermentação da cerveja produzida com o uso de leveduras imobilizadas

Tempo de fermentação (dias)	Análises				
	Acidez total (% de ácido láctico)	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)	Teor alcoólico (°GL)
1	0,23	5,35	12,75	8,36	0
2	0,25	4,98	12,15	8,32	0
4	0,27	4,81	9,50	4,78	2,30
5	0,28	4,69	8,00	4,38	2,50
6	0,29	4,61	7,00	2,33	4,90
7	0,29	4,60	7,00	2,24	4,90
8	0,29	4,60	7,00	2,21	4,90
10	0,30	4,60	7,00	2,20	4,90
15	0,30	4,54	6,75	2,18	4,90

Os resultados foram expressos como média de análises

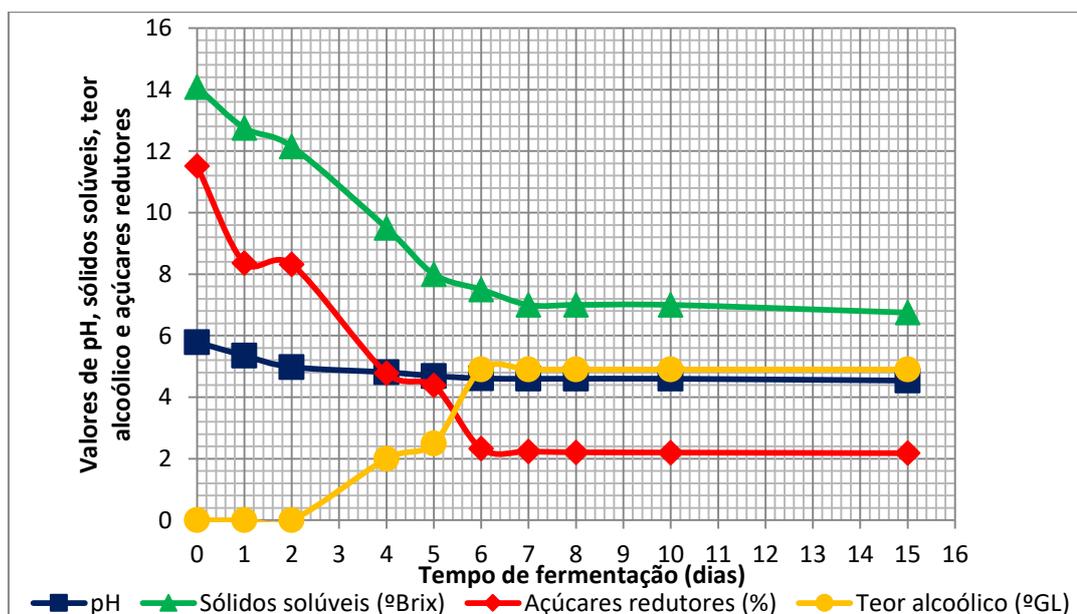


Figura 18: Cinética de fermentação da cerveja produzida com o uso de leveduras imobilizadas

Observou-se que após 4 dias de fermentação da cerveja no estilo Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas, uma parte dos açúcares do mosto (12,75°Brix e 8,36 % de açúcares redutores) foi consumida (9,5°Brix e 4,78% de açúcares redutores) e, portanto transformada em etanol (2,3°GL). Esses resultados podem ser comparados aos resultados obtidos na Tabela 13, quando ao se fermentar um mosto de 15°Brix, em uma escala menor (usando 300 mL) e usando concentração de 10% de leveduras imobilizadas em alginato 2% também se obteve em 4 dias de fermentação uma parte dos açúcares do mosto (15°Brix) consumida (11°Brix) e transformada em etanol (2,5°GL). O processo de fermentação alcoólica não finalizou em 4 dias, pois ao se utilizar mostos mais açucarados é necessário um maior tempo de fermentação alcoólica.

Na produção da cerveja Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas em alginato, para 7 litros de mosto foram pesadas 700 g de leveduras imobilizadas. Após 15 dias de fermentação alcoólica o peso de leveduras imobilizadas foi de 760,22 g. Esse resultado do peso de leveduras imobilizadas obtido em uma escala maior de produção de cerveja ficou semelhante ao resultado obtido na Tabela 6 após o primeiro uso das leveduras. No estudo do reuso das leveduras imobilizadas em alginato só se observou aumento significativo do peso das leveduras a partir do terceiro reuso. Esse estudo foi realizado em uma escala bem menor utilizando-se apenas 100 mL de mosto. Esse resultado indica uma boa perspectiva futura de se fazer reusos das leveduras imobilizadas nessa escala maior de produção de cerveja.

No estudo de ALMOCINAD et al. (2012), os autores realizaram um estudo comparativo entre a produção das cervejas no estilo Stout com leveduras livres e com leveduras imobilizadas em alginato 2%. Nas cervejas ocorreram diferenças nos valores de metabólitos secundários resultantes da fermentação alcoólica. As análises dos compostos voláteis como acetato isoamil (aroma de banana), etil caproato (aroma de abacaxi), etil caprilato (aroma de maçã) estavam com valores dobrados na cerveja elaborada com leveduras imobilizadas em relação à cerveja elaborada com leveduras livres. E compostos como acetato hexil (aroma de banana) e acetato caprilil (aroma floral) estavam presentes somente na cerveja elaborada com leveduras imobilizadas. Apesar dessa diferença, nos resultados de análise sensorial não foram observadas diferenças de sabor entre as cervejas. Talvez esse resultado da análise sensorial tenha ocorrido porque o estilo Stout é elaborado com malte torrado que tem um forte sabor de tostado, café, chocolate e esses sabores fortes se sobrepuseram aos compostos voláteis com aromas de frutas que estavam presentes em maior quantidade na cerveja elaborada com leveduras imobilizadas.

Os ésteres são importantes compostos de sabor e conferem aromas de frutas e flores nas bebidas alcoólicas fermentadas. Os ésteres são compostos desejados na cerveja quando presentes em quantidades adequadas, no entanto quando presentes em excesso podem conferir gosto enjoativo à bebida. Ésteres são produzidos pelas leveduras durante a fase de crescimento (60%) e durante a fase estacionária (40%). Tem sido relatado em alguns estudos o aumento da síntese de ésteres por leveduras imobilizadas. O principal fator que controla a síntese dos ésteres é a expressão do gene ATF1 que codifica a enzima álcool acetil transferase I. A ATF1 é reprimida na presença de oxigênio e de ácidos graxos. Alguns estudos concluíram que as condições anaeróbicas das leveduras imobilizadas limita o crescimento celular e estimula a produção de ésteres. O microambiente particular criado pela levedura imobilizada induz a expressão do gene ATF1, levando ao aumento da concentração de ésteres no produto fermentado final (WILLAERT & NEDOVIC, 2006).

Assim, para estudos futuros em relação à qualidade sensorial da cerveja Pilsen elaborada com leveduras imobilizadas, o uso de frutas tropicais como o sapoti e a atemoia torna-se interessante para mascarar o sabor dos ésteres que serão formados em maior quantidade em relação à cerveja elaborada com leveduras livres.

4.5. Aplicação das leveduras imobilizadas com uso de nanopartículas magnéticas (NPM) na fermentação alcoólica

A Tabela 11 apresenta os resultados das análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matriz de alginato 2% e NPM. Para realizar um estudo comparativo, também foi realizada a fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em alginato 2% sem nanopartículas magnéticas. A fermentação alcoólica foi realizada usando 30 g de leveduras imobilizadas e 300 mL de mosto cervejeiro a 15°Brix e 9,24 % de açúcares redutores. Para avaliar o processo de fermentação alcoólica, alíquotas de mosto fermentado foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas e analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis (graus Brix). Após 96 horas de fermentação, foi analisado o grau alcoólico (°GL) do fermentado e as leveduras imobilizadas foram pesadas.

Tabela 11: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matrizes de alginato e alginato-NPM

Leveduras imobilizadas	Sólidos solúveis (°Brix)				Teor alcoólico (°GL)	Peso das leveduras imobilizadas (g)
	24 h	48 h	72 h	96 h		
Alginato-NPM¹	14,2±0,43	13,0±0,01	12,0±0,05	11,0±0,01	2,5±0,14	41,53±0,16
Alginato²	14,0±0,05	13,2±0,26	12,0±0,01	11,0±0,01	2,5±0,05	41,72±0,09

¹leveduras imobilizadas em matriz de alginato e nanopartículas magnéticas, ²leveduras imobilizadas em alginato sem nanopartículas magnéticas. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média e desvio padrão.

Após 96 horas de fermentação, tanto para as leveduras imobilizadas em alginato-NPM quanto para as leveduras imobilizadas em alginato sem nanopartículas magnéticas, uma parte dos açúcares do mosto (15°Brix) foi consumida (11°Brix) e, portanto transformada em etanol (2,5°GL). Para ambos os casos, a fermentação alcoólica não se completou em 96 horas, pois foi utilizado um mosto com maior teor de açúcares e assim seria necessário um maior tempo de fermentação alcoólica para reduzir o mosto a 6,0°Brix e atingir a graduação alcoólica de 5,0-6,0°GL, como observado nos processos anteriores deste estudo em que se utilizou um mosto a 13°Brix. As leveduras se multiplicaram dentro da matriz de alginato e no final da fermentação aumentaram seu peso de 30 g para 41,53-41,72 g (ganho de peso de 27,76% a 28,09%).

Outros trabalhos também citaram o aumento de tempo de fermentação necessário para completar a fermentação alcoólica de mostos com maior concentração de açúcares (NAJAFPOUR et al., 2004; NAYDENOVA et al., 2014). No estudo de NAYDENOVA ET AL. (2014), o aumento do teor de sólidos solúveis do mosto de 8,5 para 17,5 °Brix resultou em um aumento de 2,5 vezes do tempo necessário para as leveduras finalizarem a fermentação alcoólica na temperatura de 12,5°C. E no estudo de NAJAFPOUR ET AL. (2004), o estudo da produção de etanol por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato mostraram que para mostos com maior concentração de açúcares foi necessário um maior tempo de retenção do mosto no reator para as leveduras finalizarem a fermentação alcoólica (para a concentração de glicose de 25 g/L o tempo de retenção foi de 3 horas e para a concentração de glicose de 50 g/L o tempo de retenção foi de 6 horas).

Verificou-se que as nanopartículas de ferro se soltaram do alginato e migraram para a solução de mosto fermentado. A Figura 19 apresenta as fotos das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM antes (1) e depois da fermentação alcoólica (2), pela mudança da cor das esferas é possível observar que o ferro das nanopartículas se despreendeu do alginato.

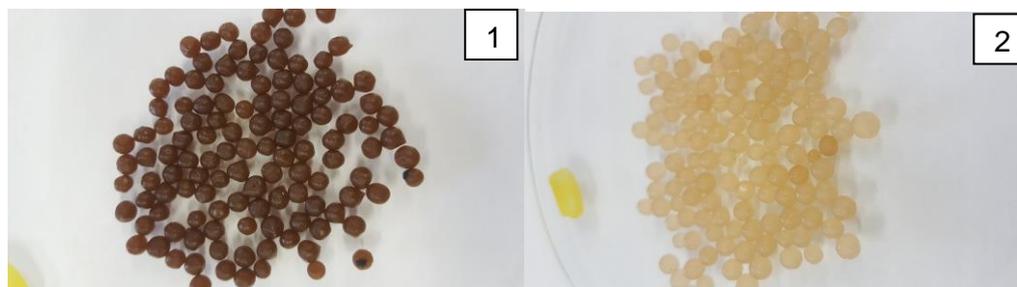


Figura 19: Fotos das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM antes e depois da fermentação alcoólica. 1- Esferas de alginato-NPM antes da fermentação; 2- Esferas de alginato-NPM depois da fermentação. Fonte: próprio autor

A Tabela 12 apresenta os resultados das análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matriz de alginato 2%, NPM 2%, glutaraldeído 0,2% e quitosana 0,2%. Para realizar um estudo comparativo, também foi realizada uma fermentação alcoólica com leveduras livres. A fermentação alcoólica foi realizada usando 14 g de leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto a 12°Brix. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de mosto fermentado e as alíquotas foram analisadas em relação a teor de sólidos solúveis (graus Brix) e concentração de ferro livre na solução.

Tabela 12: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana

Tempo de fermentação alcoólica	Leveduras imobilizadas		Leveduras livres
	Sólidos solúveis (°Brix)	Teor de ferro no mosto ($\mu\text{g/L}$)	Sólidos solúveis (°Brix)
0 h*	12,00 \pm 0,00	15,30 \pm 0,84	12,00 \pm 0,00
24 h	11,80 \pm 0,00	17,33 \pm 4,84	12,00 \pm 0,00
48 h	11,80 \pm 0,00	22,78 \pm 0,35	9,00 \pm 0,00
72 h	11,20 \pm 0,00	19,98 \pm 4,78	6,80 \pm 0,00
96 h	11,20 \pm 0,00	19,41 \pm 4,27	6,80 \pm 0,00
144 h	8,40 \pm 0,10	19,02 \pm 0,25	6,50 \pm 0,00

*0 h = mosto antes da inoculação das leveduras. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram apresentados como valores da média \pm desvio padrão.

O ensaio com as leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana na fermentação alcoólica foi realizado na tentativa de imobilizar as NPM na matriz. Nesse ensaio as NPM ficaram ligadas na matriz e não houve escape de ferro para o mosto (valores de 15,30 $\mu\text{g/L}$ em 24 h a 19,41 $\mu\text{g/L}$ em 96 h). Porém a difusão de substrato para dentro da levedura encapsulada ficou prejudicada e dessa forma não houve fermentação alcoólica do mosto nas primeiras 96 horas (praticamente não houve redução dos teores sólidos solúveis, cujos valores variaram de 12°Brix em 24 horas a 11,2°Brix em 96 horas). Enquanto isso, no ensaio com leveduras livres após 72 horas de fermentação a maior parte dos açúcares do mosto (12°Brix) foi consumida (6,8°Brix) e transformada em etanol.

Porém houve indício de atividade celular dentro da matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana após 144 horas. A multiplicação das leveduras no interior das esferas provavelmente abriu os poros da matriz e permitiu a difusão do mosto para o interior das esferas e assim observou-se uma redução dos teores sólidos solúveis, 8,4°Brix em 144 horas de fermentação alcoólica. Mesmo com os poros abertos, a leitura de concentração de ferro em 144 horas (19,02 $\mu\text{g/L}$) demonstrou que não houve escape de nanopartículas de ferro para o mosto, assim concluindo que a imobilização na matriz polimérica foi realizada com sucesso (Figura 20).

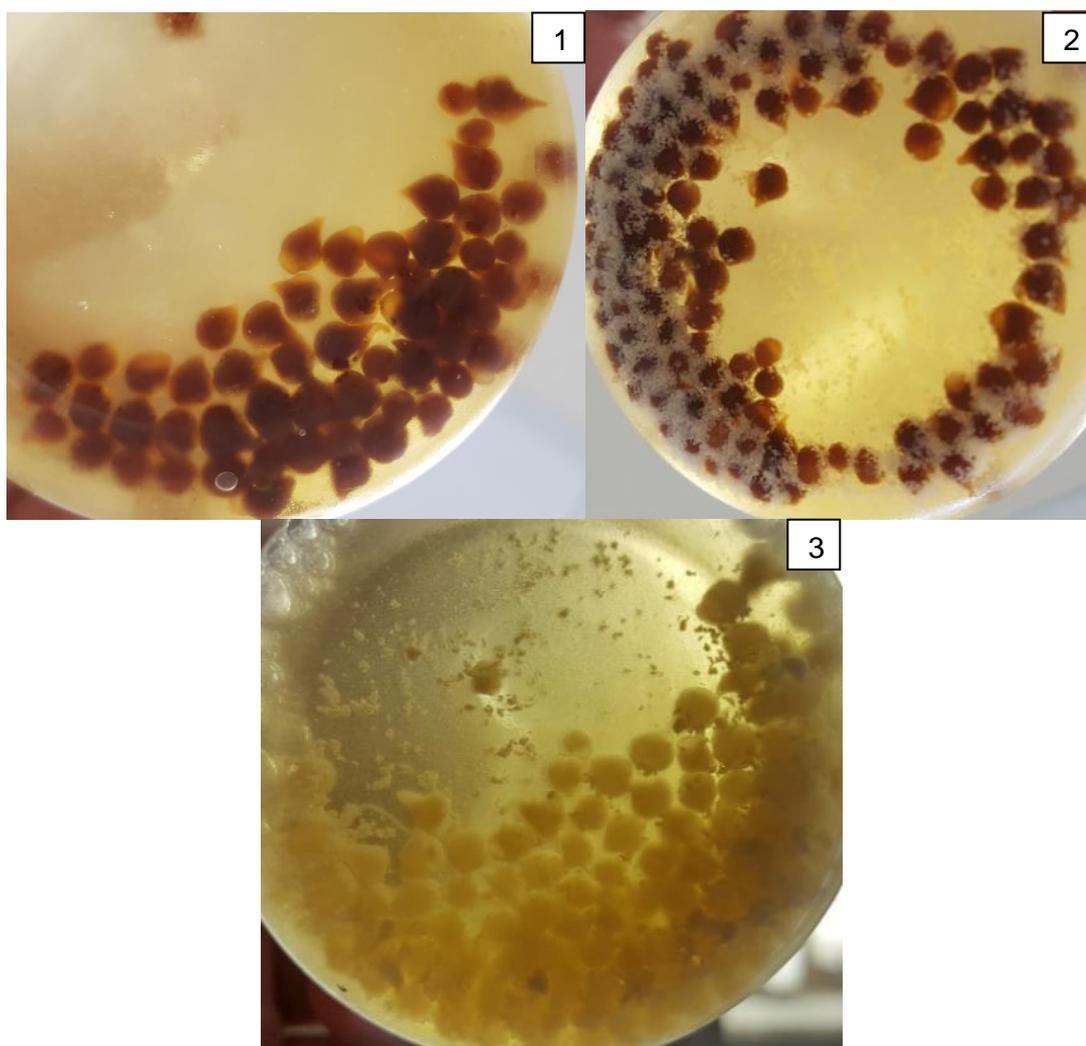


Figura 20: Aplicação das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana na fermentação alcoólica; 1- Esferas com Ferro no início da fermentação; 2- Esferas com Ferro após 144 horas de fermentação com sinais de leveduras livres; 3- Esferas sem Ferro após 144 horas de fermentação com sinais de leveduras livres. Fonte: próprio autor

A Tabela 13 apresenta os resultados das análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM, alginato-NPM-glutaraldeído e alginato-NPM-quitosana na fermentação alcoólica. Para realizar um estudo comparativo, também foi feito um ensaio com leveduras livres. A fermentação alcoólica foi realizada usando 14 g de leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto a 12°Brix. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática a 15°C e nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas foram retiradas alíquotas de mosto fermentado para análise do teor de sólidos solúveis (graus Brix).

Tabela 13: Análises físico-químicas dos mostos fermentados por leveduras imobilizadas em matrizes de alginato-NPM, alginato-NPM-glutaraldeído e alginato-NPM-quitosana na fermentação alcoólica.

Ensaio	Sólidos solúveis (°Brix)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Leveduras livres	12,1	11,1	8,1	6,2
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM	11,0	10,2	7,8	6,2
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM e glutaraldeído 0,2%	11,9	11,9	11,1	11,1
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM e glutaraldeído 0,1%	12,0	12,0	11,1	11,1
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM e glutaraldeído 0,05%	12,1	12,0	11,1	11,1
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM e quitosana 0,1%	12,1	12,1	11,1	11,1
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM e quitosana 0,05%	12,1	12,1	11,1	11,1
Leveduras imobilizadas em alginato-NPM, glutaraldeído 0,05% e quitosana 0,05%	12,1	12,1	11,1	11,1

O sistema de leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM funcionou e houve fermentação alcoólica do mosto açucarado, observado através da redução do teor de sólidos solúveis. Após 72 horas de fermentação, tanto para as leveduras imobilizadas em alginato-NPM quanto para as leveduras livres, a maior parte dos açúcares do mosto foi consumida (transformada em etanol). Em 96 horas, o processo fermentação se completou e os ensaios com leveduras imobilizadas em alginato-NPM e com leveduras livres apresentaram teor de sólidos solúveis de 6,2°Brix.

No estudo de IVANOVA, PETROVA E HRISTOV (2011), também foi descrito a aplicação de leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM na fermentação alcoólica. Para realizar a imobilização das leveduras, os autores misturaram as leveduras, a solução de alginato 3% e as nanopartículas magnéticas secas (preparadas pela precipitação em meio alcalino de Ferro II e Ferro III). Essa mistura foi gotejada em cloreto de cálcio 2% para a formação de esferas. As esferas imobilizadas foram mantidas por 2 horas no cloreto de cálcio e então lavadas com água destilada para remover o excesso de cálcio e obtiveram-se as

leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM. As esferas de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato-NPM apresentaram estabilidade sem redução de atividade durante 168 horas de fermentação alcoólica contínua. Não foi reportado pelos autores escape das nanopartículas de ferro da matriz de alginato para o meio de fermentação (IVANOVA, PETROVA e HRISTOV, 2011).

Para estudar a influência do glutaraldeído e da quitosana na fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em alginato-NPM, foram realizados vários ensaios com alginato-NPM e uso de glutaraldeído e com alginato-NPM e uso de quitosana. Nesses ensaios as NPM ficaram ligadas nas matrizes e não houve escape de ferro para o mosto. Porém a difusão de substrato para dentro da levedura encapsulada ficou prejudicada e dessa forma não houve fermentação alcoólica do mosto em 96 horas (não houve redução dos teores sólidos solúveis, cujos valores variaram de 12,1°Brix em 24 horas a 11,1°Brix em 96 horas).

No presente estudo as leveduras imobilizadas em alginato-NPM foram mantidas por 12 horas na solução de quitosana 0,2, 0,1 ou 0,05 %. No estudo de NAYDENOVA et al. (2014), as leveduras imobilizadas em alginato 3% foram deixadas por apenas 1 hora na solução de quitosana 0,38% e após esse tempo as esferas foram lavadas com água para remover o excesso de quitosana. E no estudo de DUARTE et al. (2013), as leveduras imobilizadas em alginato 3% foram deixadas por apenas 30 minutos na solução de quitosana 0,25% e após esse tempo as esferas foram lavadas com água para remover o excesso de quitosana.

O excesso de tempo de contato das esferas de alginato com a solução de quitosana provavelmente reduziu muito a porosidade da matriz do gel que, então, mostrou limitação difusional. De acordo com FINOTELLI (2010) e SHU (2002), o uso concomitante do alginato e quitosana cria uma interação eletrostática dos grupamentos amina da quitosana e dos grupamentos carboxila do alginato, formando um complexo alginato/quitosana que diminui o tamanho dos poros da matriz polimérica. Assim essa hipótese tenta explicar a dificuldade de difusão do mosto para o interior das esferas que comprometeu o processo de fermentação alcoólica pelas leveduras imobilizadas em matriz de alginato-quitosana.

Quanto ao uso do glutaraldeído, no presente estudo este foi misturado com a levedura e o alginato e depois a solução foi gotejada em cloreto de cálcio para formação das esferas. Segundo KLEINA et al. (2016), embora o glutaraldeído seja o composto químico mais utilizado para realizar ligação cruzada entre matrizes, ele é conhecido por sua toxicidade celular e tem capacidade de fazer ligação com o DNA e as proteínas das células. Então, a

metodologia mais indicada para o uso do glutaraldeído com matrizes como o alginato ou a quitosana e células vivas, é que primeiramente se faça a encapsulação dessas células vivas com os polímeros como alginato e depois se faça a imersão das esferas imobilizadas em uma solução de glutaraldeído. Dessa forma, as células vivas estarão mais protegidas da toxicidade do glutaraldeído dentro da matriz polimérica e ainda assim, será possível o glutaraldeído fazer ligações cruzadas com a parte externa do suporte de imobilização, garantindo dessa forma maior estabilidade do sistema imobilizado.

No estudo de KAWAGUTI et al. (2006), as células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato foram tratadas com solução 0,06% de glutaraldeído por 20 min. e tiveram estabilidade aumentada. As células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato e tratadas com glutaraldeído mantiveram a taxa de conversão da sacarose em isomaltulose em 50% a mais durante 12 dias de reação em comparação com as células imobilizadas em alginato e não tratadas com o glutaraldeído. E no estudo de ZHANG, PRABHU, LEE (2010) as células recombinantes de *Escherichia coli* imobilizadas em alginato e tratadas com solução 0,1% de glutaraldeído tiveram uma redução significativa de escape celular para o meio de reação, aumentando assim a estabilidade do biocatalisador que manteve a conversão de arabinose em ribulose em 89% em relação à taxa inicial por 33 dias.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo foram produzidas as cervejas artesanais no estilo Pilsen com adição das frutas sapoti e atemoia em sua composição. A adição de frutas aumentou o teor de compostos fenólicos totais das cervejas de atemoia (111,29 mg/100 mL) e de sapoti (77,61 mg/100 mL) em relação à cerveja sem frutas (64,00 mg/100 mL) e também aumentou o teor alcoólico das cervejas de atemoia e de sapoti (5,0°GL) em relação à cerveja sem frutas (4,6 °GL). E a adição de polpa de atemoia aumentou a atividade antioxidante da cerveja de atemoia em relação à cerveja sem frutas. A utilização de frutas na formulação de cervejas permite a criação de novos estilos e esses estilos de cervejas com frutas vêm ganhando espaço no Brasil. As cervejas com frutas valorizam o uso das frutas regionais e também despertam a atenção dos consumidores.

Para a produção da cerveja Pilsen com o uso de leveduras imobilizadas utilizou-se a concentração de leveduras 10 % (p/v) imobilizadas em alginato 2 % (p/v). A fermentação alcoólica se completou em 6 dias, quando o teor de sólidos solúveis do mosto foi reduzido a

7,0°Brix e atingiu-se a graduação alcoólica de 4,9°GL. Após 15 dias de fermentação os valores não tiveram alteração significativa, apresentando a cerveja verde um teor alcoólico de 4,9°GL, 6,8°Brix e 2,2% de açúcares redutores. Para estudos futuros em relação à qualidade sensorial da cerveja Pilsen elaborada com leveduras imobilizadas, a adição de frutas exóticas como adjunto cervejeiro torna-se interessante para mascarar o sabor dos ésteres que são formados em maior quantidade em relação à cerveja Pilsen elaborada com leveduras livres.

O resultado da aplicação das leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM mostrou que houve fermentação alcoólica do mosto e redução do teor de sólidos solúveis de 12°Brix para 6,2°Brix em 96 horas de fermentação. O problema apresentado pela matriz de alginato-NPM foi que as nanopartículas de ferro se soltaram do alginato e migraram para a solução de mosto fermentado. Na tentativa de prender as NPM na matriz, foi realizado o ensaio com as leveduras imobilizadas em matriz de alginato-NPM-glutaraldeído-quitosana na fermentação alcoólica. Nesse ensaio as NPM ficaram ligadas na matriz e não houve escape de ferro para o mosto. Porém a difusão de substrato para dentro da levedura encapsulada ficou prejudicada e dessa forma não houve fermentação alcoólica do mosto em 96 horas (praticamente não houve redução dos teores sólidos solúveis, cujos valores variaram de 12°Brix em 24 horas a 11,2°Brix em 96 horas). Enquanto isso, no ensaio com leveduras livres após 72 horas de fermentação a maior parte dos açúcares do mosto (12°Brix) foi consumida (6,8°Brix) e transformada em etanol.

No presente estudo as leveduras imobilizadas foram mantidas por 12 horas na solução de quitosana. O excesso de tempo de contato das esferas de alginato com a solução de quitosana provavelmente reduziu muito a porosidade da matriz do gel que, então, mostrou limitação difusional. Baseado na literatura sugere-se em estudos futuros que o tempo de permanência das leveduras imobilizadas na solução de quitosana seja de 30-60 minutos para evitar a oclusão da matriz polimérica.

Quanto ao uso do glutaraldeído, no presente estudo este foi misturado com a levedura e o alginato e depois a solução foi gotejada em cloreto de cálcio para formação das esferas. Para evitar a toxicidade do glutaraldeído, sugere-se para estudos futuros que primeiramente se faça a encapsulação das leveduras no alginato e depois se faça a imersão das esferas imobilizadas na solução de glutaraldeído. Dessa forma, leveduras estarão mais protegidas da toxicidade do glutaraldeído dentro da matriz polimérica e ainda assim, será possível o glutaraldeído fazer ligações cruzadas com a parte externa do suporte de imobilização, garantindo dessa forma que as nanopartículas magnéticas fiquem presas no alginato.

6. REFERÊNCIAS

- Abrabre. Categorias [Internet]. 2014. Disponível em: www.abrabe.org.br
- Albarghouthi M, Fara DA, Saleem M, El-Thaher T, Matalka K, Badwan A. Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. **Intern. J. Pharmac.** 2000; 206:23-34.
- Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T. Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. **J. Inst. Brew.** 2014; 120(4): 289–314.
- Almonacid SF, Nájera AL, Young ME, Simpson RJ, Acevedo CA. A Comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts. **Food Bioprocess Technol.** 2012; 5: 750–758.
- Amici E, Tetradis-Meris G, Torres PC, Jousse F. Alginate gelation in microfluidic channels, **Food Hydrocolloids.** 2008; 22:97-104.
- Aron, PM, Shellhammer TH. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. **J. Inst. Brew.** 2010; 116(4):369–380.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Gaithersburg: AOAC; 2006.
- Araújo FB, Silva PHA, Minim VPR. Sensorial and physical-chemical evaluation of beers deriving from two segments of Brazilian market. **Food Sci. Technol.** 2003; 23(2):121-128.
- Bamforth CW, Russel I, Stewart G. Handbook of alcoholic beverages series - Beer – A quality Perspective.USA: Elsevier; 2009.
- Barbosa TM. Desenvolvimento de cerveja artesanal com polpa de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* deg) e avaliação da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica. TCC (Farmácia). Universidade de Brasília; 2016.
- Barros AA, Barros EBPA. Química dos alimentos: produtos fermentados e corantes. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química; 2010.
- Becherán-Marón L, Peniche C, Argüelles-Monal W. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight. **Int. J. Biolog. Macromol.** 2004; 34:127- 133.
- Berlowska, J, Kregiel, D, Ambroziak, W. Physiological tests for yeast brewery cells immobilized on modified chamotte carrier. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2013; 104:703–714.
- Bonciu C, Stoicescu A. Obtaining and characterization of beers with cherries. **Innov. Rom. Food Biotechnol.** 2008; 3:23–27.

Botelho BG. Perfil e teores de amins bioativas e características físico-químicas em cervejas. Tese (Mestrado). Faculdade de Farmácia. UFMG; 2009.

Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 8, de 17 de janeiro de 2014. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) dos produtos de cervejaria no MERCOSUL. Diário Oficial da União. 2014 jan. 22; Seção 1, pág. 13.

Brasil. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas; 2009.

Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R. Chemistry of wort boiling. In *Brewing: Science and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap. 9, p. 306-325.

Brunelli LT, Mansano AR, Venturini Filho WG. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Braz. J. Food Technol.** 2014; 17(1):19-27.

Callemien D, Collin S. Structure, organoleptic properties, quantification methods and stability of phenolic compounds in beer: A review. 2009; **Food Rev. Int.** 26:1-84.

Carvalho GBM, Silva DP, Bento CV, Vicente AA, Teixeira JA, Felipa MGA, Silva JBA Banana as adjunct in beer production: Applicability and performance in fermentative parameters. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 2009; 155:356–365.

Carvalho LG. Produção de Cerveja. Dossiê Técnico. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossietechnico/downloadsDT/NTc>>

Cervbrasil. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, 2014. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf>.

Coelho BCP, Siqueira ER, Ombredane AS, Joanitti GA, Chaves SB, Da Silva SW, et al. Maghemite–gold core–shell nanostructures (g- Fe₂O₃@Au) surface-functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy. *RSC Adv* [Internet]. **Royal Society of Chemistry**; 2017;7:11223–32.

Colombo M. et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chem. Soc. Rev.**, 2012; 41:4306–4334.

Covizzi LG, Giese, EC, Gomes, E, Dekker RHF, Silva R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina.** 28 (2):143-160; 2007.

Donadini G, Porretta S. Uncovering patterns of consumers' interest for beer: a case study with craft beers. **Food Res. Int.** 2017; 91:183–98.

Dragone G, Mussatto SI, Nogueira AD, Silva JBA. Produção de cerveja: Microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. **Braz. J. Food Technol.** 2008, 10:240-251

Duarte JC, Rodrigues JAR, Moran PJS, Valença GP, Nunhez JR. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation, **AMB Express**, 2013; 3 (31):3-8.

Eblinger HM, Narzib L. Beer, **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 5: 178-220; 2012.

Finotelli PV, Da Silva D, Sola-Penna M, Rossi AM, Farina M, Andrade LR, et al. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. **Colloids Surfaces B Biointerfaces** [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;81(1):206–11.

Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **J. Biol. Chem.** 1912; XII: 239-243.

Fontana DHG. Elaboração de um modelo para o controle do processo de pasteurização em cerveja envasada (In-Package). Tese (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

Flores AB, Graff A, Cornelius E, Souza, GFV. Perfil sensorial e avaliações físico-químicas de cerveja artesanal de chocolate e caramelo. **Rev. Dest. Acad.** 2015; 7(4):158-166.

Freitas GL. et al. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS E DPPH. **Alimentos Nutr.** 2006; 17(3):303-307.

Ganbaatar C. et al. Liquid chromatographic determination of polyphenols in czech beers during brewing process. **Potravinarstvo Sci. J. Food Ind.** 2015; 9(1): p. 24-30.

George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **J. Controlled Release.** 2006; 114: 1-14.

Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **Eur. J. Cancer.** 2005 Sep.; 41(13):1941–1954.

Gorinstein S, Caspi A, Zemser M, Trakhtenberg, S. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. **Nutr. Res.** 2000; 20(1):131-139.

Haminiuk CWI, Plata-Oviedo MSV, Guedes AR, Stafussa AP, Bona E, Carpes, ST. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **Int. J. Food Sci. Technol.** 2011; 46:1529-1537.

Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits – an overview. **Int. J. Food Sci. Technol.** 2012; 47:2013-2024.

Hornsey ISA. History of beer and brewing, RSC Paperbacks: The Royal Society of Chemistry; 2003.

IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, São Paulo: IMESP, 2008. Disponível em: http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf

Ivanova V, Petrova P, Hristov J. Application in the ethanol fermentation of immobilized yeast cells in matrix of alginate/magnetic nanoparticles, on chitosan-magnetite microparticles and cellulose-coated magnetic nanoparticles. **Int. Rev. Chem. Eng.** 2011; 3:289 – 299.

Janegitz BC, Lourenção BC, Lupetti KO, Fatibello-Filho O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Quim. Nova.** 2007; 30(4):879-884.

Kawaguti HY, Sato HH. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quim. Nova.** 2008; 31(1):134-143.

Kawaguti HY, Buzzato, MF, Orsi DC, Suzuki GT, Sato HH. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. **Process Biochem.** 2006; 41:2035–2040.

Kleina M P et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and beta-d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers.** 2016; 137:184–190.

Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.** 2002; 50:3713-3717.

Kunze, W. Tecnología para cerveceros y malteros. cap. 7, p. 826-885. Berlín: VLB Berlin, 2006.

Lima LLA, Filho ABM. Tecnologia de Bebidas. Sistema Escola Técnica aberta do Brasil; 2011.

Liu X, Kaminski MD, Guan Y, Chen H, Liu H, Rosengart AJ. Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel. **J. Magn. Magn. Mater.** 2006; 306(2):248–53.

Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Res.** 2008; 8:1018-1036.

Martins VMR Rodrigues MÂ Produção e tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada. **Livro de atas: Instituto Politécnico de Bragança;** 2015.

Mega JF, Neves E, Andrade CJA. Produção da cerveja no Brasil. Rev. **Citino.** 2011; 1(1):34-42.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 1959; 31(4): 426-436.

Morais PLD, Lima LCO, Alves RE, Filgueiras HAC, Almeida AS. Alterações físicas, fisiológicas e químicas durante o armazenamento de duas cultivares de sapoti, **Pesq. Agropec. Bras.,** v.41, n.4, p.549-554, 2006.

Moura C. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor.** 2006; 16:37-45.

Najafpour G, Younesi H, Syahidah K, Ismail K Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technol.** 2004; 92: 251–260.

Naydenova V, Badova M, Vassilev S, Iliev V, Kanev M, Kostov G Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: lab-scale optimization of lager beer fermentation **Biotechnology & Biotechnological Equipment.** 2014; 28(2): 277-284.

Nedovic V, Willaert R, Leskosek-Cukalovic I, Obradovic B, Bugarski B. Beer production using immobilized cells. In: Nedovic, V, Willaert R, editors. **Applications of cell immobilisation biotechnology.** New York, NY: Springer; 2005. p. 259

Nikolic´ S, Mojovic´ L, Pejin D, Rakin M, Vukašinovic´ M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoiseus*. **Biomass Bioenerg.** 2010; 34(10):1449-1456.

Nogueira, ARS. Fermentação contínua de mosto com leveduras imobilizadas em alginato. Tese (Mestrado), Universidade de Aveiro, 2009.

Ogbonna JC, Amano Y, Nakamura K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **J. Ferment. Bioeng.** 1989; 67(2):92-96.

Oliveira VS, Afonso MRA, Costa JMC. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de sapoti liofilizado. **Rev. Ciênc. Agron.** 2011; 42 (2):342-348.

Oliveira MES. Elaboração de bebida alcoólica fermentada de cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) empregando leveduras livres e imobilizadas. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Lavras; 2010.

Orsi DC, Carvalho VS, Nishi ACF, Damiani C, Asquiere ER. Use of sugar apple, atemoya and soursop for technological development of jams – chemical and sensorial composition. **Ciênc. Agrotec.** 2012; 36 (5):560-566.

Pereira FR, Leitão AM. Análises físico-químicas de cervejas tipo Pilsen comercializadas em Itaquí, RS. **Rev. Salão Pesq.** 2016; 8 (2). Disponível em: <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/18277>

Petcharoen K, Sirivat A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Mater Sci Eng B Solid-State Mater Adv Technol* [Internet]. Elsevier B.V. 2012;177(5):421–427.

Piazzon A, Forte M, Nardini M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:10677–10683.

Pinto LIF, Zambelli RA, Pontes DF Desenvolvimento de cerveja artesanal com acerola (*Malpighia emarginata* DC) e abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill). **Rev. Verde Agroec. Desenvolv. Sustent.** 2015; 10(3):67-71.

Plessas S, Bekatoro A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM, Marchant R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. **Bioresour. Technol.** 2007; 98(4):860-865.

Prasad MP. In-vitro evaluation of antioxidant properties of fermented fruit beer samples, *Int. J. Sci. Res.* 2014; 3(11):1545-1550.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation de colorization assay. **Free Radical Biology & Medicine.** 1999; 26 (9/10):1231–1237.

Rebello FFP. Produção de Cerveja. **Rev. Agrogeo Amb.** 2009; 145-155.

Riegger BR, Bäurer B, Mirzayeva A, Tovar GEM, Bach M. A systematic approach of chitosan nanoparticle preparation via emulsion crosslinking as potential adsorbent in wastewater treatment. *Carbohydr Polym* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2018;180:46–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.002>

Rio RF. Desenvolvimento de uma cerveja formulada com gengibre (*Zingiber officinalis*) e hortelã do Brasil (*Mentha arvensis*): avaliação de seus compostos bioativos e comparação com dois estilos de cerveja existentes no mercado. Tese (Mestrado). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia; 2013.

Rodrigues MI, Lemma AF. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Casa do Pão Editora, 2014.

Rosa NA Afonso JC. A Química da Cerveja. **Quím. Nova Escola.** 2015; 37(2):98-105.

Sanna V, Pretti L. Effect of wine barrel ageing or sapa addition on total polyphenol content and antioxidant activities of some Italian craft beers. *Internat. J. Food Sci. Technol.* 2015; 50(3):700–707.

Santos MS, Ribeiro FM. Cervejas e refrigerantes. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em: http://www.crq4.org.br/downloads/ervejas_refrigerantes.pdf

Sigma Aldrich Catálogo de produtos Sigma Aldrich, 2007. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/417963?lang=pt®ion=BR&cm_sp=Insite_-_recent_fixed_-_recent5-5https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/340855?lang=pt®ion=BR&gclid=EA1aIQobChMIpKDXsKfG2AIVFgeRCh3NUgNvEAAAYASAAEgLUa_D_BwE

Siqueira S. Cervejas industriais ficaram 40% menos amargas nos últimos 20 anos, aponta estudo; 2014. Disponível em: <http://www.siqueiranews.com/2014/08/ervejas-industriais-ficaram-40-menos.html>.

Siqueira PB, Bolini HMA, Macedo GAO processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alim. Nutri.** 2008; 19:491-498.

Silva HSRC, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quím. Nova.** 2006; 29(4):776-785.

Silva AV, Andrade DG, Yagui P, Carnelossi AG, Muniz EN, Narain N. Packing and refrigeration for atemoya preservation. **Food Sci. Technol.** 2009; 29(2):300–304.

Shu X., Zhu K. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. **Eur J Pharm Biopharm.** 2002;54(2):235–43.

Soares RMD, Francisco A, Rayas-Duarte P, Soldi V. Brazilian hull-less and malting barley genotypes: Chemical composition and partial characterization, **J. Food Quality.** 2007; 30(3):357-371.

Sobrinho RB. Potencial de exploração de anonáceas no nordeste do Brasil. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2010.

Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Rezaei K. Health-related aspects of beer: a review, **Int. J. Food Properties.** 2012; 15(2):350-373.

Supattarasakda K, Petcharoen K, Permpool T, Sirivat A, Lerdwijitjarud W. Control of hematite nanoparticle size and shape by the chemical precipitation method. **Powder Technol** [Internet]. Elsevier B.V.; 2013; 249:353–359.

Tafulo PAR, Queiros RB, Delerue-Matos CM, Sales MGF. Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. **Food Res. Internat.** 2010; 43:1702-1709.

Taylor K. Sour Beers: It's more than just Ph. **Craft brewer's conference.** 2015; 1 (1) : 12-16.

Trindade, SC. Incorporação de amora na elaboração de cerveja artesanal. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria; 2015.

Venturini Filho WG, Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia. São Paulo: Edgard Blücher. 2010.

Venturini Filho WG, Cereda MP. Cerveja. Biotecnologia Industrial – Biotecnologia na Produção de Alimentos. 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher. 2001.

Vogel, C. Avaliação da adição de pequenas frutas (berries) na produção de cerveja artesanal: análise físico-química, sensorial, compostos fenólicos e atividade antioxidante. TCC (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal da Fronteira Sul; 2017.

Yalçin E, Çelik S, Akar T, Sayim I, Köksel H. Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey, **Food Chem.** 2007; 101(1):171-176.

Willaert R, Nedovic VA. Primary beer fermentation by immobilised yeast – a review on flavour formation and control strategies. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 2006; 81:1353–1367.

Zhang B et al. Preparation of highly fluorescent magnetic nanoparticles for analytes-enrichment and subsequent biodetection. **J. Colloid Interface Sci.** 2011; 353:426–432.

Zhang YW, Prabhu P, Lee JK Alginate immobilization of recombinant Escherichia coli whole cells harboring l-arabinose isomerase for l-ribulose production. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2010; 33(6):741-748.

Zhou Z, Li G, Li Y. Immobilization of Saccharomyces cerevisiae alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **Int. J. Biol. Macromol.** 2010; 47(1): 21-26.

7. ANEXO – Artigo submetido a **Brazilian Journal of Food and Technology**

Produção de cervejas artesanais com as frutas sapoti (*Manilkara sapota* L.) e atemoia (*Annona cherimoia*, Mill. x *Annona squamosa* L)

RESUMO

A adição de frutas tropicais como adjunto cervejeiro pode fornecer um produto inovador e as frutas também são uma alternativa em fonte de açúcares para as leveduras realizarem a fermentação alcoólica. O objetivo deste estudo foi à produção de cervejas artesanais no estilo Pilsen, com adição das frutas tropicais sapoti e atemoia em sua composição. A polpa de atemoia foi adicionada no mosto cervejeiro na concentração de 8,5% (p/v) e a polpa de sapoti na concentração de 17% (p/v). O processo de fermentação alcoólica ocorreu a 15°C por 15 dias e o processo de maturação das cervejas verdes ocorreu a 5°C por 15 dias. Após engarrafamento e carbonatação na própria garrafa realizaram-se as análises físico-químicas das três cervejas produzidas: cerveja sem adição de frutas (cerveja Pilsen), cerveja com polpa de atemoia (cerveja de atemoia) e cerveja com polpa de sapoti (cerveja de sapoti). Os mostos utilizados na produção das cervejas apresentaram 14,77-15,00°Brix e 7,51-7,88% de açúcares redutores. A adição das polpas de frutas não aumentou a acidez das cervejas de atemoia (0,32 %) e de sapoti (0,28 %) em relação à cerveja sem frutas (0,34 %), pois tanto a atemoia quanto o sapoti são frutas pouco ácidas. O teor alcoólico obtido foi de 4,6°GL para a cerveja sem frutas e 5,0°GL para as cervejas de atemoia e de sapoti. A adição das polpas de frutas aumentou o teor de compostos fenólicos totais das cervejas de atemoia (111,29 mg/100 mL) e de sapoti (77,61 mg/100 mL) em relação à cerveja sem frutas (64,00 mg/100 mL). A utilização de frutas na formulação de cervejas permite a criação de novos estilos e esses

estilos de cervejas com frutas vêm ganhando espaço no Brasil. As cervejas com frutas valorizam o uso das frutas regionais e também despertam a atenção dos consumidores.

Palavras-Chave: cerveja com frutas; frutas tropicais; estilo Pilsen; cerveja artesanal, atemoia, sapoti

Development of artisanal beers with fruits sapoti (*Manilkara sapota* L.) and atemoia (*Annona cherimoia*, Mill. x *Annona squamosa* L)

ABSTRACT

The addition of tropical fruits as an adjunct brewer can provide an innovative product and fruits are also an alternative source of sugars for the yeast to carry out alcoholic fermentation. The objective of this study was the production of artisanal beers in the Pilsen style, with the addition of tropical fruits sapoti and atemoia in their composition. The atemoia pulp was added into the brewing wort at a concentration of 8.5% (w/v) and the sapoti pulp at the concentration of 17% (w/v). The process of alcoholic fermentation occurred at 15°C for 15 days and the process of maturing the green beers occurred at 5°C for 15 days. After bottling and carbonation in the own bottle, the physical and chemical analyzes of the three beers produced were performed: beer without added fruit (Pilsen beer), beer with atemoia pulp (atemoia beer) and beer with sapoti pulp (sapoti beer). The worts used in the production of beers presented 14.77-15.00°Brix and 7.51-7.88% of reducing sugars. The addition of fruit pulps did not increase the acidity of atemoia beer (0.32%) and sapoti beer (0.28%) in relation to non-fruit beer (0.34%), because both atemoia and sapoti are low acid fruits. The alcohol content was 4.6°GL for non-fruit beer and 5.0°GL for atemoia and sapoti beers. The addition of fruit pulps increased the total phenolic compounds content of atemoia beer (111.29 mg / 100 mL) and sapoti beer (77.61 mg / 100 mL) compared to non-fruit beer (64.00 mg / 100ml). The use of fruits in the formulation of beers allows the creation of new styles and these styles of fruits beers have been gaining ground in Brazil. Fruits beers value the use of regional fruits and also attract consumers' attention.

Key-Words: fruit beer; tropical fruits; Pilsen style; artisanal beer, atemoia, sapoti

1. INTRODUÇÃO

A maior parte da produção cervejeira no Brasil é proveniente das grandes cervejarias que produzem as cervejas tradicionais. No entanto, as microcervejarias estão mais voltadas para a elaboração das cervejas artesanais. A cerveja artesanal é caracterizada como um produto de excelente qualidade e alto valor de mercado, possuindo aromas e sabores diferentes. A produção da cerveja artesanal está voltada para um mercado consumidor que busca diversidade e prioriza uma bebida de melhor qualidade sensorial (ARAÚJO et al., 2003; DONADINI e PORRETTA, 2017; LODOLO et al. 2008).

A cerveja pode ser definida como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Malte é o produto obtido pela germinação e secagem da cevada, devendo o malte de outros cereais ter a designação acrescida do nome do cereal de sua origem. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a 45% em relação ao malte de cevada (BRASIL, 2009).

As frutas são um dos adjuntos possíveis de se utilizar na produção de cerveja artesanal. Frutos têm sido utilizados como adjuntos cervejeiros há séculos, especialmente no estilo belga Lambic (Fruits Lambics). A adição de frutas como cereja, framboesa e pêssego são comuns para este estilo de cerveja (PRASAD, 2014). As frutas banana (CARVALHO et al., 2009) e cereja (BONCIU e STOICESCU, 2008) foram descritas e usadas com sucesso na produção de cervejas com frutas.

A adição de frutas tropicais como adjunto cervejeiro pode fornecer um produto inovador e as frutas também são uma alternativa em fonte de açúcares para as leveduras realizarem a fermentação alcoólica. O sapoti (*Manilkara sapota* L.) é um fruto nativo da América Central e pertence à família *Sapotaceae*. No Brasil, os estados nordestinos se destacam na produção de sapoti (MORAIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011). O fruto maduro apresenta bom rendimento em polpa, poucas sementes e alto teor de açúcares solúveis (sólidos solúveis totais de 15,67°Brix e teor de açúcares de 11,17%) (OLIVEIRA et al., 2011).

A atemoia (*Annona squamosa* x *Annona cherimola*) é um híbrido interespecífico entre a cherimoia (*Annona cherimola* Mill) e a ata, pinha ou fruta do conde (*Annona squamosa* L.) e pertence à família *Annonaceae*, sendo oriunda da América do Sul. A atemoia é cultivada principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Esta fruta vem conquistando nos últimos anos a preferência dos consumidores por apresentar algumas vantagens em relação à pinha. Entre as vantagens, o fruto apresenta menor número de sementes e maior rendimento em polpa (SILVA et al, 2009; SOBRINHO, 2010). No estudo de ORSI et al. (2012), na caracterização da polpa de atemoia *in natura*, a média de sólidos solúveis totais foi de 25,10°Brix o teor de açúcares foi de 21,93% .

Como muitas frutas tropicais, tanto o sapoti como a atemoia são considerados frutos exóticos e apresentam grande potencial para industrialização. Esses frutos são populares nas regiões tropicais e muito apreciados por seu sabor. Contudo, tais frutos apresentam alta perecibilidade e perdas pós-colheita, tendo um rápido amadurecimento, o que dificulta sua conservação e comercialização. O uso de tecnologia de processamento pode ser uma solução para aproveitar o excedente da produção destes frutos, que na maioria das vezes são consumidos somente *in natura*. A polpa congelada, o suco e o sorvete são os produtos geralmente produzidos a partir das frutas tropicais (OLIVEIRA et al. 2011; ORSI et al., 2012). Assim, o objetivo deste estudo foi à produção de cervejas artesanais no estilo Pilsen, formuladas com adição das frutas tropicais sapoti e atemoia em sua composição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matérias-primas utilizadas na produção de cerveja

As matérias primas foram adquiridas do fornecedor Brew Market, São Paulo, SP. A levedura comercial utilizada foi à alemã Lager W 34/70 Fermentis®. O malte utilizado foi o tipo Pilsen Best Malz importado da Alemanha, sendo que os grãos foram adquiridos inteiros e a moagem foi feita no laboratório. E o lúpulo utilizado foi o de aroma SAAZER adquirido em pellets e importado da República Tcheca.

2.2. Elaboração do mosto cervejeiro

A elaboração do mosto cervejeiro iniciou-se com o processo de mosturação que consistiu em misturar o malte moído (2,3 kg) com de água mineral (6 litros) em uma panela grande com torneira embutida. O aquecimento na mosturação teve três etapas: 30 min a 50-55°C, 30 min a 60-65°C and 30 min a 70-75°C. Após a mosturação, o bagaço de malte foi lavado com 5 litros de água quente. A lavagem teve a função de extrair o máximo de açúcares ainda presentes no bagaço de malte. Então o mosto foi separado do bagaço de malte e seguiu para o processo de fervura por 1 hora e durante a fervura realizou-se a adição de lúpulo (40 g). Após a etapa de fervura do mosto, foi realizada a correção do volume final do mosto para 7 litros com adição de água e com auxílio de um refratômetro de bancada para acerto do teor de sólidos solúveis. O resfriamento do mosto a 18°C foi realizado com auxílio de um trocador de calor. O mosto resfriado foi filtrado com uma peneira de aço inox para eliminar resíduos de cascas de bagaço de malte e de lúpulo e então se fez adição das polpas das frutas.

Adição das polpas de atemoia e sapoti no mosto cervejeiro

Os frutos atemoia e sapoti foram adquiridos na Central de Abastecimento (CEASA, Brasília, DF). Os frutos de atemoia foram cultivados no estado de São Paulo e os frutos de sapoti eram provenientes do estado de Pernambuco. No laboratório, os frutos foram sanitizados em solução contendo hipoclorito de sódio e lavados em água corrente antes do uso. Os frutos foram despulpados e as sementes foram descartadas. A polpa de atemoia foi adicionada no mosto cervejeiro na concentração de 8,5% (p/v) e a polpa de sapoti foi adicionada no mosto cervejeiro na concentração de 17% (p/v). A polpa de atemoia apresentou 20°Brix e a polpa de sapoti apresentou 21°Brix.

2.3. Fermentação alcoólica e maturação das cervejas

O processo de fermentação alcoólica foi iniciado com a adição de levedura seca previamente hidratada (0,7 g/litro) ao mosto. A fermentação ocorreu em câmara climática a 15°C por 15 dias. No fim do processo de fermentação alcoólica, as leveduras e o bagaço de atemoia ou sapoti se sedimentaram no fundo do fermentador e a cerveja verde foi trasfegada com auxílio de uma bomba de vácuo para garrafas previamente higienizadas, sendo esse sedimento

eliminado. Para o processo de maturação, as cervejas verdes foram colocadas em refrigerador a 5°C por 15 dias. Foram elaboradas três cervejas: cerveja sem adição de frutas (cerveja Pilsen), cerveja com polpa de atemoia (cerveja de atemoia) e cerveja com polpa de sapoti (cerveja de sapoti).

Carbonatação e engarrafamento

As cervejas foram colocadas em garrafas de vidro âmbar de 600 mL e para o processo de carbonatação, foi efetuada a adição de xarope de glicose (1 g/litro) e uma suspensão de leveduras (0,2 g/litro). As cervejas engarrafadas foram lacradas com recravadora comum e armazenadas a temperatura ambiente por 15 dias para formação de gás carbônico.

Análises físico-químicas

O pH foi determinado em pHmetro digital (AOAC, 2006). A acidez total foi determinada através da titulação com NaOH 0,1 N (IAL, 1985). O teor de sólidos solúveis (graus Brix) foi determinado por refratômetro de bancada a 20°C. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ADNS ou ácido 3-5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959). Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN e DENIS, 1912). O grau alcoólico das cervejas determinou-se com uso de alcoômetro de Gay-Lussac (°GL) colocado diretamente em volume de 250 mL de destilado a 20°C (IAL, 1985). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média e desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises físico-químicas dos mostos cervejeiros

Os mostos utilizados na produção das cervejas deste estudo apresentaram 14,77 a 15,00°Brix e 7,51 a 7,88% de açúcares redutores (açúcares fermentescíveis como maltose e glicose) (Tabela 1). No estudo de Bonciu e Stoicescu (2008), o mosto utilizado na produção da cerveja com adição de cerejas apresentou 13,26°Brix e no estudo de estudo de Carvalho et al. (2009), o mosto utilizado na produção da cerveja com adição de bananas apresentou 12,00°Brix. De

acordo Briggs et al. (2004), o mosto de malte de cevada apresenta 47% de maltose, 14% de maltotriose, 8% de glicose (açúcares fermentescíveis) e 30,5% de dextrinas (açúcares não fermentescíveis).

Tabela 1 – Análises físico-químicas dos mostos cervejeiros

Análises	Mosto 1	Mosto 2
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01
pH	5,85 ± 0,01	5,51 ± 0,02
Sólidos solúveis (°Brix)	15,00 ± 0,01	14,77 ± 0,02
Açúcares redutores (%)	7,88 ± 0,28	7,51 ± 0,23
Fenólicos totais (mg/100 mL)	80,34 ± 0,19	77,26 ± 0,04

Mosto 1 – utilizado na produção da cerveja sem adição de frutas e da cerveja com polpa de atemoia. Mosto 2 – utilizado na produção da cerveja com polpa de sapoti. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições.

Os mostos deste estudo apresentaram acidez de 0,20 a 0,22 % e pH de 5,51 a 5,85. No estudo de Brunelli et al. (2014) foi reportado resultado parecido, onde o mosto cervejeiro apresentou valor médio de acidez de 0,15 % e pH de 5,83. De acordo com Flores et al. (2015), o pH do mosto cervejeiro deve situar-se entre 5,0 e 6,0, ocorrendo acidificação no processo posterior de fermentação alcoólica. E de acordo com Pereira e Leitão (2016), a acidez total do mosto cervejeiro deve encontrar-se entre 0,1 e 0,3 % de ácido láctico.

Os teores de compostos fenólicos dos mostos desse estudo variaram de 77,26 a 80,34 mg/100mL. No estudo de Barbosa (2016) o mosto utilizado na produção da cerveja com polpa de maracujá apresentou 99,00 mg/100mL de compostos fenólicos. Segundo Aron e Shellhammer (2010), no mosto cervejeiro cerca de 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% se originam do lúpulo.

A Tabela 2 apresenta as análises físico-químicas das cervejas sem adição de frutas (cerveja Pilsen), com polpa de atemoia (cerveja de atemoia) e com polpa de sapoti (cerveja de sapoti).

Tabela 2 – Análises físico-químicas das cervejas

Análises	Cerveja Pilsen	Cerveja de atemoia	Cerveja de sapoti
Acidez titulável (% de ácido láctico)	0,34 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,01
pH	4,16 ± 0,01	4,23 ± 0,01	4,51 ± 0,03
Sólidos solúveis (°Brix)	8,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	6,06 ± 0,15
Açúcares redutores (%)	1,94 ± 0,07	1,14 ± 0,03	1,28 ± 0,14
Fenólicos totais (mg/100 mL)	64,00 ± 0,15	111,29 ± 0,03	77,61 ± 0,05
Teor alcoólico (°GL)	4,60 ± 0,28	5,00 ± 0,07	5,00 ± 0,01

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições.

Neste estudo a adição das polpas de atemoia e sapoti não aumentou a acidez das cervejas de atemoia (0,32 %) e de sapoti (0,28 %) em relação à cerveja sem frutas (0,34 %), pois tanto a atemoia quanto o sapoti são frutas pouco ácidas. No estudo de Orsi et al. (2012) a polpa de atemoia *in natura* apresentou acidez de 0,54 % e no estudo de Oliveira et al. (2011) a polpa de sapoti *in natura* apresentou acidez de 0,08 %. No entanto, é comum observar um aumento da acidez com a adição de polpas de frutas nas cervejas. No estudo de Trindade (2016) as cervejas tiveram valores de acidez aumentados com a adição de maior quantidade polpa de amora e a polpa de amora *in natura* apresentou acidez de 1,56 %.

As cervejas no estilo Pilsen geralmente apresentam teor alcoólico entre 3,0 e 5,0°GL (HORNSEY, 2003). O teor alcoólico obtido para as cervejas deste estudo foi de 4,6°GL para a cerveja sem frutas e 5,0°GL para as cervejas de atemoia e de sapoti. Resultados parecidos foram obtidos no estudo de Bonciu e Stoicescu (2008), onde a cerveja com cerejas apresentou teor alcoólico de 4,9°GL. No estudo de Carvalho et al. (2009) a cerveja elaborada com banana apresentou teor alcoólico de 5,3°GL, enquanto a cerveja sem frutas apresentou menor teor alcoólico de 4,7°GL. A adição de polpas de frutas com altos teores de açúcares como a banana, o sapoti e a atemoia contribuíram com aumento dos teores alcoólicos das cervejas de frutas.

O teor de compostos fenólicos totais da cerveja no estilo Pilsen (sem adição de frutas) deste estudo foi de 64 mg/100mL. Freitas et al. (2006) reportaram valores de compostos fenólicos de 40 a 80 mg/100mL para diferentes tipos de cerveja (cervejas de trigo clara e escura, cervejas de cevada clara e escura de diferentes marcas). No estudo de Ganbaatar et al. (2015), a análise dos compostos fenólicos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência identificou maiores concentrações de catequina e ácido gálico e menores concentrações de ácido ferúlico, rutina, ácido vanílico e ácido p-cumárico em todas as amostras de cervejas no estilo Pilsen analisadas. No estudo de Piazzon, Forte e Nardini (2010), os diferentes estilos de cervejas analisadas apresentaram valores de compostos fenólicos de 48 mg/100mL (Pilsen) a 87 mg/100mL (Bock). Na análise de identificação de compostos fenólicos, em todas as cervejas o ácido ferúlico foi o composto fenólico encontrado em maior quantidade.

Neste estudo a adição das polpas de frutas aumentou o teor de compostos fenólicos totais das cervejas de atemoia (111,29 mg/100 mL) e de sapoti (77,61 mg/100 mL) em relação à cerveja sem frutas (64,00 mg/100 mL). É comum observar um aumento do teor de compostos fenólicos totais com a adição de polpas de frutas nas cervejas, pois a maioria das frutas é rica em compostos fenólicos (HAMINIUK et al., 2012; HAMINIUK et al., 2011). No estudo de Trindade (2016), as cervejas tiveram os compostos fenólicos aumentados com a adição de maior quantidade polpa de amora, apresentando valores de 480,5 e 632,1 mg/100 mL, nas cervejas com adição de 10 e 30% de polpa de amora, respectivamente. No estudo de Vogel (2017), a adição da polpa de mirtilo aumentou a concentração de polifenóis da cerveja de mirtilo (95,0 mg /100 mL) em relação a cerveja Pilsen (sem adição de frutas) que apresentou 73,4 mg /100 mL.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo a adição das polpas de atemoia e sapoti não aumentou a acidez das cervejas de atemoia e de sapoti em relação à cerveja sem frutas, pois tanto a atemoia quanto o sapoti são frutas pouco ácidas. No entanto, a adição de polpas de frutas com altos teores de açúcares contribuíram para o aumento dos teores alcoólicos e de compostos fenólicos totais das cervejas de sapoti e de atemoia. A utilização de frutas na produção de cerveja garante uma doçura residual, aroma e sabor característico, conferindo-lhe uma maior variedade de compostos aromáticos. A utilização de frutas na formulação de cervejas permite a criação de

diversos estilos de cervejas com frutas e esses estilos vêm ganhando espaço no seguimento microcervejeiro no Brasil. As cervejas com frutas valorizam o uso das frutas regionais e despertam a atenção de consumidores no Brasil e também no mercado internacional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists, **Official methods of analysis**. 18rd ed. Gaithersburg: AOAC; 2006.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Sensorial and physical-chemical evaluation of beers deriving from two segments of Brazilian market. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2003.

ARON, P.M.; SHELLHAMMER, T. H. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. **Journal of Institute of Brewing**, v. 116, n. 4, p. 369–380, 2010.

BRASIL, **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm Acesso em: 21 de Janeiro de 2018.

BARBOSA, T. M. **Desenvolvimento de cerveja artesanal com polpa de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. Flavicarpa* deg) e avaliação da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica**. 2016. 56 p. TCC (Farmácia). Universidade de Brasília, 2016.

BONCIU, C.; STOICESCU, A. Obtaining and characterization of beers with cherries. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 3, p. 23–27, 2008.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Chemistry of wort boiling**. In *Brewing: Science and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap. 9, p. 306-325.

BRUNELLI, L. T., MANSANO, A. R., VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 19-27, 2014.

CARVALHO, G. B. M.; SILVA, D. P.; BENTO, C. V.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; FELIPA, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Banana as adjunct in beer production: Applicability and performance in fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 356–365, 2009.

DONADINI, G.; PORRETTA, S. Uncovering patterns of consumers' interest for beer: a case study with craft beers. **Food Research International**, v. 91, p. 183–98, 2017.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 239-243, 1912.

FLORES, A. B.; GRAFF, A.; CORNELIUS, E.; SOUZA, G. F. V. Perfil sensorial e avaliações físico-químicas de cerveja artesanal de chocolate e caramelo, **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 7, n. 4, p. 158-166., 2015.

FREITAS, G. L., et al. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS E DPPH. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 3, p. 303-307, 2006.

GANBAATAR, C. et al. Liquid chromatographic determination of polyphenols in czech beers during brewing process. **Potravinarstvo Scientific Journal for Food Industry**, v. 9, n. 1, p. 24-30, 2015.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of brasilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 46, p. 1529-1537, 2011.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 47, p. 2013-2024, 2012.

HORNSEY, I. S. A. **History of beer and brewing**, RSC (RSC Paperbacks): The Royal Society of Chemistry, p. 75-82. 2003.

IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1. ed. digital São Paulo: IMESP, 2008.

LODOLO, E. J.; KOCK, J. L. F.; AXCELL, B. C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1018-1036, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 4, p. 426, 1959.

MORAIS, P. L. D.; LIMA, L. C. O.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALMEIDA, A. S. Alterações físicas, fisiológicas e químicas durante o armazenamento de duas cultivares de sapoti, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 549-554, 2006.

OLIVEIRA, V. S.; AFONSO, M. R. A.; COSTA, J. M. C. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de sapoti liofilizado. **Revista Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 342-348, 2011.

ORSI, D. C.; CARVALHO, V. S.; NISHI, A. C. F.; DAMIANI, C.; ASQUIERI, E. R. Use of sugar apple, atemoya and soursop for technological development of jams – chemical and sensorial composition. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n. 36, v. 5, p. 560-566, 2012.

PEREIRA, F. R.; LEITÃO, A. M. Análises físico-químicas de cervejas tipo Pilsen comercializadas em Itaqui, RS. **Revista do Salão de Pesquisas**, v. 8, n. 2, 2016. Disponível em: <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/18277> Acesso em: 21 de Janeiro de 2018.

PIAZZON, A.; FORTE, M.; NARDINI, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 58, p. 10677–10683, 2010.

PRASAD, M. P. In-vitro evaluation of antioxidant properties of fermented fruit beer samples. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 11, p. 1545-1550, 2014.

SILVA, A. V.; ANDRADE, D. G.; YAGUIU, P.; CARNELOSSI, A. G.; MUNIZ, E. N.; NARAIN, N. Packing and refrigeration for atemoya preservation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p.300–304, 2009.

SOBRINHO RB. **Potencial de exploração de anonáceas no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.

TRINDADE, S. C. **Incorporação de amora na elaboração de cerveja artesanal**. 2015. 62 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

VOGEL, C. **Avaliação da adição de pequenas frutas (berries) na produção de cerveja artesanal: análise físico-química, sensorial, compostos fenólicos e atividade antioxidante**. 2017. 79 p. TCC (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal da Fronteira Sul, 2017.