

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA DE LIMA

FABRICAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* COMO AGENTE FERMENTADOR

FRANCISCO BELTRÃO

2022

BIANCA DE LIMA

**FABRICAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii* COMO AGENTE FERMENTADOR**

**Production craft beer using *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* as
fermenting agent**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ellen Porto Pinto.

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Claudia Eugênia Castro
Bravo.

FRANCISCO BELTRÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

BIANCA DE LIMA

**FABRICAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae var. *bouardii* COMO AGENTE FERMENTADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 10/junho/2022

Ellen Porto Pinto
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Claudia Eugênia Castro Bravo
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

João Francisco Marchi
Mestrado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

FRANCISCO BELTRÃO

2022

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.”

RESUMO

O mercado cervejeiro tem se tornado competitivo quanto à diferenciação dos seus produtos e valor agregado. A busca por produtos com apelo de saudabilidade, como probióticos vem crescendo exponencialmente. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* isolada da lichia inicialmente, tem sido usada fortemente como probiótico no tratamento de doenças gastrointestinais. O objetivo deste trabalho é a produção de uma cerveja artesanal estilo *Cream Ale* utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* como agente fermentador. A produção da bebida seguiu os passos básicos da fabricação fervura, clarificação, resfriamento, fermentação, maturação e envase. As leveduras foram pré-inoculadas utilizando Dry Malt Extract. Na formulação A foi inoculada a levedura *S. cerevisiae* US-05 e na formulação B foi inoculada a levedura *S. bouardii* em sua forma comercial, proveniente do Floratil®. A fermentação foi conduzida a temperatura de 17°C por 2 dias, a temperatura foi elevada para 20°C por mais 10 dias e a maturação ocorreu a 0°C por 10 dias. Após a cerveja ser envasada, a mesma permaneceu em repouso por mais 20 dias a temperatura ambiente média de 15°C. Nas cervejas elaboradas foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: pH, cor, amargor, teor alcoólico, extrato real, extrato primitivo e turbidez. Também foram determinados os compostos fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante por 3 diferentes métodos das cervejas produzidas. Por fim, foi realizada análise sensorial das cervejas por método descritivo com a técnica *Perfil Flash*. Alguns valores encontrados para as análises físico-químicas da formulação A foram de 4,59% ABV, 2,46 °Plato para o extrato real e 23,4 EBC para a turbidez, já na formulação B esses valores foram de 3,76% ABV, 4,11 °Plato e 46,8 EBC, demonstrando que ocorreu baixa conversão de substrato e baixa atenuação. As cervejas apresentaram parâmetros dentro do estabelecido por relatórios cervejeiros para o estilo *Cream Ale*. Para os compostos bioativos a cerveja fermentada com *S. bouardii* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos e conseqüentemente atividade antioxidante, exceto para atividade antioxidante pelo método ABTS que não apresentou diferença significativa. A atividade antioxidante das cervejas produzidas tem forte correlação com o conteúdo de flavonoides. Na análise sensorial os termos que melhor descreveram as cervejas produzidas foram dulçor e aroma de levedura, não sendo perceptível diferenças sensoriais entre elas.

Palavras-chave: bebidas fermentadas; fermentação alcoólica; leveduras.

ABSTRACT

The beer market has become competitive in terms of product differentiation and added value. The search for products with health appeal, such as probiotics, has been growing exponentially. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* isolated from lychee initially, has been used heavily as a probiotic in the treatment of gastrointestinal diseases. The objective of this work is the production of a Cream Ale style craft beer using *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a fermenting agent. The beverage production followed the basic steps of boiling, clarifying, cooling, fermenting, maturing and packaging. Yeasts were pre-inoculated using Dry Malt Extract. In formulation A the yeast *S. cerevisiae* US-05 was inoculated and in formulation B the yeast *S. boulardii* was inoculated in its commercial form, from Floratil®. Fermentation was carried out at a temperature of 17°C for 2 days, the temperature was raised to 20°C for another 10 days and the maturation took place at 0°C for 10 days. After the beer was bottled, it remained at rest for another 20 days at an average room temperature of 15°C. In the elaborated beers, the following physical-chemical analyzes were carried out: pH, color, bitterness, alcohol content, real extract, primitive extract and turbidity. The total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity were also determined by 3 different methods of the beers produced. Finally, a sensory analysis of the beers was performed by a descriptive method with the Flash Profile technique. Some values found for the physicochemical analyzes of formulation A were 4.59% ABV, 2.46 °Plato for the real extract and 23.4 EBC for turbidity, where as in formulation B these values were 3.76% ABV , 4.11 °Plato and 46.8 EBC, demonstrating that there was low substrate conversion and low attenuation. The beers presented parameters within the established by brewers reports for the Cream Ale style. For the bioactive compounds, the beer fermented with *S. boulardii* showed a higher amount of phenolic compounds and consequently antioxidant activity, except for antioxidant activity by the ABTS method, which showed no significant difference. The antioxidant activity of the produced beers has a strong correlation with the flavonoid content. In the sensory analysis, the terms that best described the beers produced were sweetness and yeast aroma, with no perceptible sensory differences between them.

Keywords: fermented beverages; alcoholic fermentation; yeasts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1	Mercado cervejeiro	10
3.2	Processo de produção de cerveja	12
3.2.1	Insumos	12
3.2.2	Processo produtivo	15
3.3	Processo fermentativo	17
3.4	Agente fermentativo - diversidade de <i>Saccharomyces</i> e sua história evolutiva	19
4	MATERIAL E METÓDOS	22
4.1	Produção da cerveja	22
4.2	Caracterização físico-química das cervejas produzidas	25
4.2.1	Análise de pH	25
4.2.2	Determinação do amargor	25
4.2.3	Determinação de cor	25
4.2.4	Determinação do teor alcoólico	26
4.2.4.1	Álcool em volume	26
4.2.4.2	Álcool em peso	26
4.2.5	Determinação do extrato real	26
4.2.6	Determinação de extrato aparente	27
4.2.7	Determinação de extrato original	27
4.2.8	Determinação da turbidez	27
4.3	Caracterização de compostos bioativos	28
4.3.1	Determinação de compostos fenólicos totais	28
4.3.2	Determinação de flavonoides totais	28
4.3.3	Determinação da atividade antioxidante	29
4.3.3.1	Método DPPH	29
4.3.3.2	Método FRAP	29
4.3.3.3	Método ABTS	30
4.4	Análise sensorial	30
4.4.1	Seleção de julgadores	30

4.4.2	Levantamento de atributos	32
4.4.3	Perfil Livre <i>Flash</i>	32
4.5	Análise estatística	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Resultados físico-químicos da cerveja	34
5.2	Compostos bioativos	36
5.3	Análise sensorial	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE A – Ficha utilizada para análise sensorial	52
	APÊNDICE B – Atributos levantados pelo método de rede	55
	APÊNDICE C - Ficha de análise para Perfil Livre Flash	57
	APÊNDICE D – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	59
	ANEXO A - Porcentagem de álcool em volume a 20°C (% v/v) correspondente à densidade relativa.	64
	ANEXO B – Conversão da densidade relativa à 20°C/20°C em porcentagem de álcool em peso	66
	ANEXO C – Conversão da densidade relativa à 20°C/20°C em porcentagem de extrato	68

1 INTRODUÇÃO

No mundo todo, mais de 19 mil cervejarias já são registradas, desse total 94% delas são de produção artesanal. A produção de cerveja em pequena escala teve uma drástica queda no século XIX com a popularização de um único estilo, somente nas décadas de 80/90 que o setor voltou a se reestruturar, a partir desse momento voltou a crescer a demanda por diferentes estilos (SEBRAE, 2018).

O Brasil é o 3º maior consumidor de cerveja no mundo com consumo de 14,3 bilhões de litros anual, que representa 7% do consumo mundial ficando atrás da China e dos Estados Unidos, que representam 27% e 13% do consumo mundial, respectivamente. Com o aumento da renda, o consumidor costuma buscar diferenciação no produto, novos estilos e sabores. O aumento exponencial do consumo de cervejas artesanais mostra o interesse do consumidor brasileiro em adquirir cada vez mais produtos especiais, sendo este um dos diferenciais da cerveja artesanal. A perspectiva de crescimento das cervejarias artesanais é alta e conta com um cenário positivo, somente na última década apresentou um aumento de 91% no número de locais produtores da bebida (TOLEDO *et al.*, 2018; KIRIN, 2020).

O mercado aproveitou esse crescimento da cerveja artesanal, e vem tentando atrelar o consumo de cerveja com sofisticação apostando na linha *Premium*, onde está inserida a cerveja puro malte. Alinhado ao crescimento do consumo de cervejas, houve um aumento também na procura por alimentos com apelo de saudabilidade, entre eles os probióticos.

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados corretamente possuem efeito benéfico a saúde, para tal necessitam sobreviver ao pH ácido do estômago para atuar junto com a microbiota intestinal combatendo patógenos (MENDONÇA, 2021).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, descoberta e isolada primeiramente na lichia tropical (*litchi chinensis*) da Indochina por volta dos anos 50. Desde a sua descoberta até a atualidade, esta vem sendo utilizada como probiótico e adicionada a dieta alimentar. Serve de suplemento alimentar, rico em micro-organismos vivos, que afetam benéficamente quem as consome, através da melhoria do balanço da microbiota intestinal, tratando diarreias.

A levedura *S. cerevisiae* é o principal agente fermentador em micro cervejarias, tornando-se um alto custo para produtores tendo em vista que a maioria é importada de outros países. Mesmo podendo ser replicada e reutilizada em até no máximo três processos fermentativos, pode ocorrer o que chamamos de *petits mutante*, células que sofrem mutação e não trabalham de maneira esperada. O estresse por ácidos inorgânicos é encontrado nessa reciclagem de células. Estudos comprovaram que as cepas de *S. boulardii* são mais resistentes a ácidos inorgânicos, ao abaixamento do pH pela conversão do etanol e outras variáveis ambientais durante a replicação. Tornando-se uma opção viável para replicabilidade em processos fermentativos, diminuindo custos em micro cervejarias (CHERYL *et al.*, 2009; LAZO-VÉLEZ *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é produzir cerveja artesanal puro malte estilo *Cream Ale* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* como agente fermentador.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir cerveja artesanal puro malte estilo *Cream Ale* utilizando *S. cerevisiae* var. *boulardii* como agente fermentador.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir cerveja artesanal puro malte utilizando *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* var. *boulardii* como agentes fermentadores.
- Realizar análises físico-químicas nas cervejas produzidas.
- Determinar os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante das cervejas produzidas.
- Analisar sensorialmente as cervejas produzidas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mercado cervejeiro

Pouco se sabe sobre a genuína chegada da cerveja em solo brasileiro, a bebida que já era consumida na Europa desde antes de Cristo só começou a apresentar importância no país com a vinda da família real Portuguesa em 1808. Com a chegada da família real e a abertura dos portos para países parceiros, comerciantes ingleses encontraram no Brasil um mercado lucrativo trazendo consigo diversos produtos, entre eles a arte de produzir cerveja. Os primeiros indícios de fabricação em solo brasileiro datam de 1836, com um anúncio de venda de cerveja brasileira no Jornal do Comércio do Rio de Janeiro em 27 de outubro daquele ano (SILVA; LEITE; PAULA, 2016).

O início das cervejarias ocorreu com a abertura da primeira fábrica de cerveja brasileira em 1842 por um imigrante alemão. Dezesseis anos depois, já havia no país seis cervejarias produzindo o que eles chamavam de “cerveja de barbante”, apelidada assim, pelo uso de barbante para garantir que a rolha não se soltasse devido a quantidade de gás carbônico presente (SANTOS, 2003; DELIBERALLI, 2015).

Com a fundação da Antárctica Paulista em 1885 e da Cerveja Brahma Villiger e Cia em 1888, o produto passou a se destacar no país aumentando o consumo da bebida. O fim do século XIX ficou conhecido como “os anos de ouro para a ciência cervejeira” por conta dos estudos do francês Gay Lussac sobre a fórmula da fermentação e os estudos do cientista Louis Pasteur sobre a pasteurização (DELIBERALLI, 2015; PIMENTA *et al.*, 2020; ROSALIN, 2021).

No início do século XX, a cerveja passou por um grande declínio na produção e consumo causado por diversos fatores como o início de movimentos contrários ao consumo de álcool em toda a Europa e Estados Unidos, e as duas Guerras Mundiais naquele século. As Guerras causaram a escassez de matéria-prima e mão de obra, culminando na popularização de um único estilo de cerveja e o crescimento de grandes cervejarias que passaram a adquirir empresas menores e falir aquelas que não conseguiam competir nesse mercado (DELIBERALLI, 2015; SEBRAE, 2018).

Na década de 1950, com o fim da guerra e o sentimento de renovação, a cerveja voltou a se popularizar nos Estados Unidos influenciada pelos seguintes motivos: a busca por novos sabores e estilos, aumento da renda da população, o surgimento de associações

que difundiam conhecimento sobre os diferentes tipos de cerveja, a disponibilidade de recursos para a produção em pequena escala e a criação de legislações favoráveis a produção em micro cervejarias (DELIBERALLI, 2015; SEBRAE, 2018).

No Brasil a produção de cerveja artesanal retornou apenas em 1990, influenciada pela retomada da produção nos Estados Unidos e a popularização da bebida (SEBRAE, 2018).

O Brasil é o terceiro maior consumidor de cerveja com consumo aproximado de 14,3 milhões de litros/ano. O consumo per capita ainda é baixo, o país ocupa a 30ª posição no ranking mundial com um consumo de 58,4 L. ano⁻¹ enquanto a República Tcheca ocupa a primeira posição com 188,6 L ao ano (KIRIN, 2020; SINDICERV, 2022).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA) em 2020 já existiam um total de 1383 cervejarias no país com maior concentração nas regiões Sul e Sudeste, que representam um total de 85,6% dos estabelecimentos produtores. A região Nordeste apresentou um imponente crescimento nos últimos anos, estados como Piauí e Paraíba apresentaram um crescimento de número de cervejarias de 200% e 60%, respectivamente (BRASIL, 2021).

A produção de cerveja no Brasil é de 14 bilhões de litros segundo dados da Associação Brasileira de Cerveja Artesanal (ABRACERVA) desse total a fatia da cerveja artesanal é de 2,5 a 2,7% com a produção de 352 a 380 milhões de litros. Enquanto nos Estados Unidos a parcela de cerveja artesanal representa mais de 24% do mercado, esses dados indicam um mercado ainda em crescimento (ABRACERVA, 2019; FREITAS, 2019).

O último anuário da cerveja publicado em 2021 pelo MAPA mostrou um crescimento de 14,4% no número de registro de novas cervejarias no ano de 2020, abaixo do cenário menos otimista publicado no anuário anterior que previa o crescimento de 19% (BRASIL, 2021). Esse impacto nos novos registros ainda não pode ser atrelado aos danos causados pela pandemia. Para o ano de 2022 podemos esperar que se retome aos poucos o ritmo dos anos anteriores aos de pandemia, seja de novos registros, consumo e produção, segundo relatório *Year in Beer* publicado pela *Brewers Association* (2022).

Cervejeiros artesanais não buscam competitividade por quantidade produzida, mas o grande diferencial do mercado é a diversidade do produto, compactuando com o que o consumidor busca. O crescimento do consumo de cervejas artesanais está atrelado ao resgate da produção seguindo a lei da pureza e a oportunidade de novas sensações

utilizando diferentes adjuntos que abrem uma gama enorme de sabores na cerveja (RAMOS; PANDOLFI, 2019).

3.2 Processo de produção de cerveja

3.2.1 Insumos

Para a produção da bebida alcoólica mais consumida no mundo são necessários quatro ingredientes principais: água, malte, lúpulo e a levedura. A água representa quase 90% da composição da bebida, sendo o principal ingrediente, é imprescindível a garantia da qualidade da água cervejeira que deve ser incolor, inodora e insípida, fatores que atuam diretamente no sabor da bebida. Para uma cerveja de qualidade o ideal é que o pH da água seja mais ácido dentro de uma faixa de 5,2 a 8,0 para que auxilie na conversão do açúcar em álcool pela atividade enzimática (CAPECE *et al.*, 2018; SPIES, 2018; ALMEIDA, 2019).

Além de seguir os padrões de potabilidade, a água cervejeira precisa atender os padrões de íons dissolvidos como cálcio, magnésio, entre outros. A concentração de íons de cálcio (Ca^{2+}) permitidos em alimentos está entre 50 e 150 mg. L^{-1} , na produção de cerveja o cálcio atua na redução do pH facilitando a atividade enzimática e auxilia na clarificação e estabilização da cerveja. Os íons de magnésio (Mg^{2+}) devem estar entre 10 a 30 mg. L^{-1} e exercem função semelhante aos íons de cálcio, mas em concentrações acima de 30 mg. L^{-1} resultam em sabor amargo na cerveja, valores acima de 125 mg. L^{-1} a bebida apresentará efeito laxante. O íon nitrato (NO_3^-) é considerado contaminante na água cervejeira, sua concentração deve ser menor que 44 mg. L^{-1} , pois durante a fermentação poderá ser convertido a nitrito (NO_2^-), que em teores superiores a 3 ppm, é altamente tóxico as leveduras, interrompendo assim a fermentação (COELHO NETO *et al.*, 2020; PIMENTA *et al.*, 2020).

A fonte de amido para a fabricação de cerveja é o malte. Malte é o termo utilizado para designar a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal, em condições de temperatura, umidade e aeração controladas, esse processo é chamado de malteação. O principal objetivo da malteação é a obtenção de enzimas diastásicas (α e β -amilase) do conteúdo do grão, que serão imprescindíveis no processo de transformação do amido em açúcares fermentescíveis (maltose e glicose) (HOYLE *et al.*, 2020).

Para a produção cervejeira o cereal mais utilizado é a cevada, devido a taxa de germinação e alto teor de amido. O processo de malteação é dividido em 3 etapas: maceração ou umidificação, germinação e secagem. Na etapa de maceração ou umidificação, tira-se a semente do estado de dormência, elevando o teor de umidade entre 35% e 45%. O processo de absorção é realizado intercalando períodos com submersão em água e períodos onde a água é drenada, isto garante que o processo levará menos tempo. A germinação é o processo que levará a semente a formação de uma nova planta, na malteação o processo é interrompido para que se obtenham apenas as enzimas responsáveis pela quebra dos açúcares durante o processo de mostura. Após a germinação o amido presente no malte apresenta cadeias menores que na cevada, o que o torna menos duro e mais solúvel, normalmente utiliza-se temperatura de germinação entre 16 e 25 °C para a cevada. O processo de secagem inicia em uma temperatura entre 50 e 60°C até que a umidade do malte fique em torno de 23%. Logo após, aumenta-se a temperatura e diminui-se o fluxo de ar até que o grão atinja aproximadamente 12% de umidade e posteriormente, a umidade é reduzida para 6%. Na última etapa, aumenta-se a temperatura para uma faixa entre 80 e 110°C, é nessa etapa que diversos tipos de malte são criados com diferentes cores e *flavors* (VENTURINI FILHO, 2016; LEMOS, 2017; HOYLE *et al.*, 2020).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.), pertencente à família Cannabaceae, é uma planta trepadeira que pode chegar até 4 metros de altura, perene e dióica, onde surgem plantas femininas e masculinas, mas é do interesse do mercado cervejeiro apenas a planta fêmea, pois contém alta concentração de lupulina responsável pelo amargor e aroma da cerveja (RODRIGUES; MORAIS; CASTRO, 2015). A função do lúpulo é conferir a cerveja aroma e sabor. Os lúpulos de amargor são adicionados no início da fervura para que haja isomerização dos alfa-ácidos, estes que são insolúveis em temperaturas menores que 76°C, conferindo amargor a bebida. Já os lúpulos aromáticos são utilizados nos minutos finais da fervura para que os óleos essenciais sejam minimamente afetados, por conta de sua alta volatilização. Ainda por conta dos alfa-ácidos o lúpulo também apresenta função bacteriostática no mosto (TOZZETO, 2017; PIMENTA *et al.*; 2020).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* responsáveis pela fermentação típica da bebida, são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por gemulação ou brotamento. As leveduras cervejeiras são comumente divididas em dois grandes grupos: *Ale* e *Lager* (DELIBERALLI, 2015). Segundo Montenegro (2017) “devido à escassez de

critérios morfológicos, as espécies de leveduras são diferenciadas mais de acordo com as suas características fisiológicas”.

Para a produção de cervejas de alta fermentação (*Ales*) geralmente utiliza-se *S. cerevisiae* em um processo com temperatura ótima entre 18 e 24°C, essas cepas costumam apresentar aromas frutados provenientes dos ésteres formados durante a fermentação. Já para produção de cervejas de baixa fermentação as cepas de *S. pastorianus* são utilizadas, onde a temperatura ideal para fermentação está entre 8 e 14°C. As cepas *lagers* costumam apresentar aromas mais limpos resultando em cervejas com sabores mais maltados isso ocorre, pois, as baixas temperaturas dificultam a formação de ésteres responsáveis por aromas frutados (SPIES, 2018; SANNINO *et al.* 2019; COELHO NETO *et al.*, 2020).

A maior diferença entre essas cepas não está na temperatura de fermentação, mas na capacidade de utilização da melibiose. Para que se utilize o dissacarídeo melibiose (glicose-galactose) é necessária à produção da enzima extracelular α -galactosidase (melibiase), a produção da enzima só ocorre em organismos possuidores do gene MEL. As cepas de *S. pastorianus (carlsbergensis)* possuem os genes MEL permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose. Já as cepas de *S. cerevisiae* carecem desse gene impedindo a uso da melibiose (MONTENEGRO, 2017; SANTOS; ROCHA; ANDRADE, 2019).

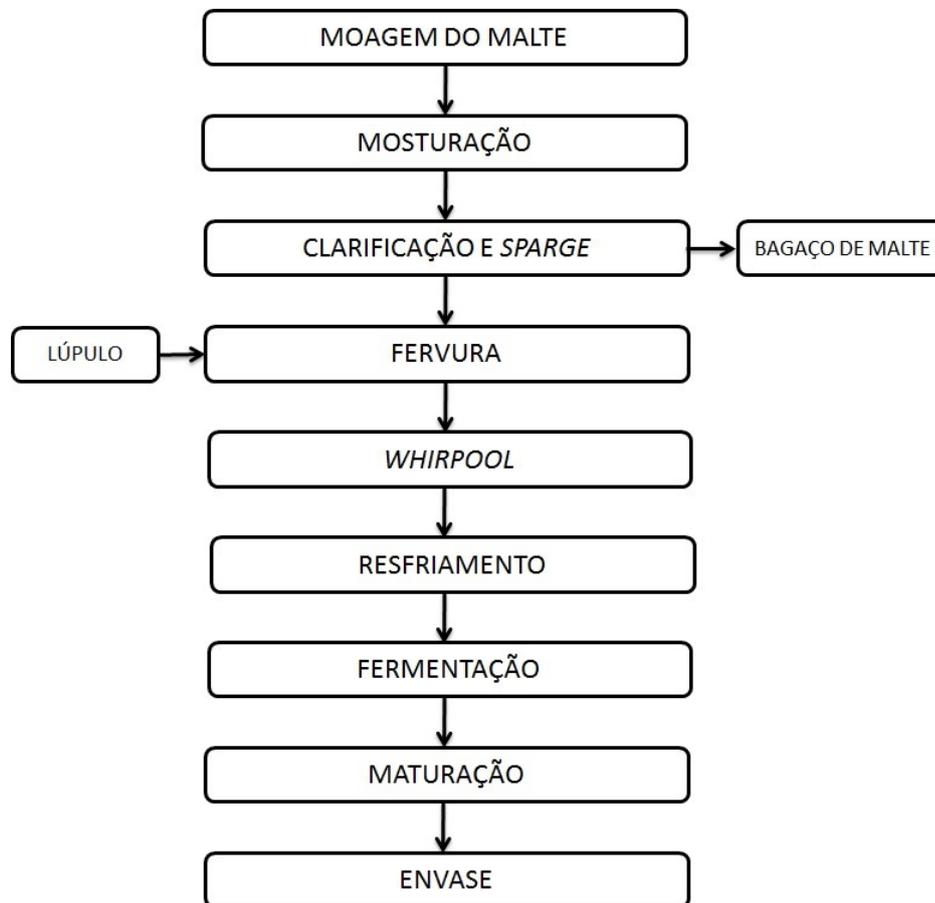
Os adjuntos cervejeiros, permitidos pela legislação brasileira, são as matérias-primas utilizadas para substituir em até 45% em peso do malte na elaboração do mosto. São considerados adjuntos a cevada cervejeira não maltada, e outros cereais maltados ou não como o trigo, milho e arroz. Esses adjuntos em sua grande maioria são utilizados para suprir a necessidade de açúcar fermentescível do processo, diminuindo custos da fabricação (BRASIL, 2019; BARBOSA *et al.*, 2020). Adjuntos como mel e outros produtos de origem animal que contenham conteúdo de amido e outros açúcares, também são previstos na legislação, mas sua quantidade máxima deve ser menor ou igual a 25% em relação ao extrato primitivo (BRASIL, 2019).

Outra opção para cervejeiros iniciantes é a produção utilizando o extrato de malte, que é encontrado no formato seco ou líquido. O uso de extrato de malte auxilia novos cervejeiros, pois retira do processo de produção as rampas de temperatura. Diminui também os custos iniciais com matéria-prima e equipamentos para realização da etapa de mostura completa (SLEIMAN, 2002).

3.2.2 Processo produtivo

O fluxograma básico para a produção da bebida está esquematizado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de produção da cerveja artesanal.



Fonte: Autoria própria (2021).

Para a produção da bebida inicialmente o malte deve ser moído de modo que exponha o endosperma do grão, é uma etapa que muito influencia na mostura. Se os grãos forem moídos muito finos facilitará a disponibilidade dos carboidratos, mas dificultará o processo de filtração, tendo em vista que a casca do grão é o meio filtrante. No caso de os grãos serem moídos de forma que fique muito grosso, a casca do grão permanecerá intocada diminuindo a conversão do amido e a disponibilidade das enzimas (ALMEIDA, 2019).

O processo de mosturação consiste na adição do malte em água aquecida, essa mistura passa por um aquecimento gradual de 40 a 78°C por períodos de tempo pré-determinados, para que haja solubilização do amido favorecendo a hidrólise do mesmo

em açúcar fermentescível pelas enzimas α e β - amilase. Na mostura obtém-se o mosto, líquido açucarado rico em dextrinas e açúcares fermentescíveis. O processo costuma ser realizado de forma semelhante para os mais variados tipos de cerveja, com variação apenas nas rampas de temperatura. Após esse processo é realizado o teste do iodo para confirmar a total sacarificação do amido. Ao fim da mostura realiza-se o *mash out* em temperaturas de 75 a 78°C para inativação das enzimas (SPIES, 2018; COELHO NETO *et al.*, 2020).

O mosto é recirculado para clarificação e filtrado para que haja separação do mosto primário e do bagaço de malte. Ao fim da filtração, o bagaço é lavado para garantia de solubilização de todo açúcar fermentescível residual que ainda permanece nas cascas do grão. O processo de lavagem é denominado *Sparge*, a água utilizada é adicionada ao mosto primário, que passa a ser o mosto secundário (DUTRA, 2019).

Após obtenção do mosto secundário inicia-se a fervura também chamada de lupulagem, pois é nesta etapa onde se adiciona o lúpulo. Durante a fervura ocorre desnaturação protéica, esterilização do mosto, extração dos compostos amargos e aromáticos do lúpulo e reações para a coloração da bebida, como a reação de Maillard. O lúpulo é adicionado no início da fervura para extração de compostos de amargor, e nos minutos finais para extração dos compostos aromáticos (TOZETTO *et al.*, 2017; COELHO NETO *et al.*, 2020).

Ao final da fervura o mosto passa por um processo denominado *whirlpool* para favorecer a decantação do *trub* (aglutinado de proteína e partículas coaguladas de lúpulo), etapa importante que irá favorecer a clarificação da cerveja. O mosto é então resfriado até que se atinja a temperatura ótima para inoculação (COELHO NETO *et al.*, 2020; PIMENTA *et al.*, 2020; NASCIMENTO, 2021).

O mosto resfriado é transferido para os tanques de fermentação e adiciona-se às cepas de *Saccharomyces*. Na etapa de fermentação, os açúcares serão convertidos em gás carbônico e etanol pela fermentação alcoólica em vias anaeróbicas. Essa etapa pode durar de 5 a 10 dias, e é dependente do estilo da cerveja produzido (COELHO NETO *et al.*, 2020; PIMENTA *et al.*, 2020).

No fim da fermentação abaixa-se a temperatura e transfere-se a cerveja verde para o maturador, retirando as leveduras inativas que decantaram na etapa de fermentação. Ainda haverá atividade fermentativa, que irá eliminar compostos indesejáveis como o diacetil. Para muitos cervejeiros a etapa de maturação é o ‘afinamento’ da cerveja, pois ocorrerá clarificação devido a decantação de leveduras e

proteínas, e acentuação de sabores e aromas (TOZETTO, 2017; COELHO NETO *et al.*, 2020).

A última etapa é o envase, onde o gás carbônico é adicionado. A carbonatação pode ocorrer de duas maneiras: por meio de adição direta de CO₂ através de contrapressão do tanque (carbonatação forçada) ou por meio da adição de uma quantidade controlada de açúcares que iniciaram uma refermentação, onde o CO₂ produzido pela levedura presente irá solubilizar na bebida (carbonatação natural). A carbonatação natural só é possível em cervejas que não passam por processo de pasteurização (SPIES, 2018; COELHO NETO *et al.*, 2020).

3.3 Processo fermentativo

A fermentação alcoólica é a conversão do açúcar em etanol e CO₂ por um processo anaeróbico que visa à produção de energia, este processo ocorre no citoplasma celular seguindo a via glicolítica ou de Embden- Meyerhof-Parnas. A sequência das reações bioquímicas que acontecem na via glicolítica inicia-se com a fosforilação do açúcar, e envolve 12 reações ordenadas catalisadas por sua enzima específica. A glicose sofre isomerização convertendo em frutose, que tornará o açúcar mais suscetível às transformações bioquímicas e enzimáticas até a conversão em piruvato, produto intermediário. Em anaerobiose, o piruvato será descarboxilado a acetaldeído, que seguidamente será reduzido a etanol pelo uso de NADH⁺ (AMARAL, 2009; PIRES, 2017; ALTERTHUM, 2020).

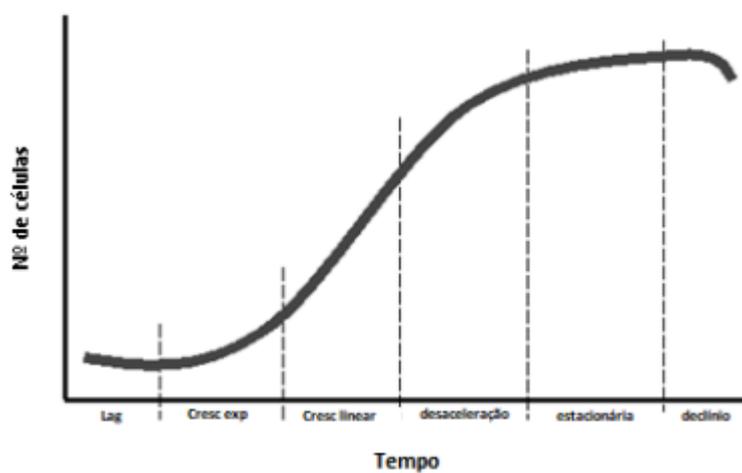
A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é classificada como uma levedura aeróbia facultativa, pois pode apresentar metabolismo respiratório ou fermentativo, alternadamente. O metabolismo de conversão dos açúcares pela levedura é responsável por gerar energia em formato de ATP (adenosina-trifosfato), essa energia é utilizada em mecanismos de sobrevivência da levedura como absorção, excreção e reprodução. Os produtos de excreção da via glicolítica como etanol, glicerol e ácidos orgânicos podem ser utilizados pela levedura em condições aeróbicas para geração de ATP e biomassa (LIMA, 2019).

As enzimas glicolíticas, responsáveis por este processo, são influenciadas por diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos como temperatura, e pH do mosto, nutrientes minerais (N, K, P, Mg, entre outros), espécie, linhagem e concentração da levedura e contaminações bacterianas no meio (AMARAL, 2009; ALTERTHUM, 2020).

Outros fatores que limitam a produtividade é a presença de inibidores como sulfito, excesso de íons de cálcio e potássio.

Uma vez que as leveduras são inoculadas inicia-se o processo fermentativo. O crescimento celular é dividido em quatro principais fases: *lag*, *log*, estacionária e de declínio, mas entre estas, algumas outras fases serão enumeradas (Figura 2).

Figura 2 – Curva de crescimento típico da levedura.



Fonte: PAIXÃO (2018).

No início do processo fermentativo, tem-se a fase *lag*, de adaptação ou latência, não há reprodução celular, mas a levedura sintetiza enzimas necessárias para o processo. A duração dessa fase inicial está relacionada com a concentração de células inoculadas e o estado fisiológico do microrganismo. Como nessa fase inicial não há reprodução celular, X (concentração celular) = X_0 (concentração inicial celular) que são constantes (PAIXÃO, 2018).

Entre a fase *lag* e a *log* (crescimento exponencial), há uma fase de transição onde se observa o início da reprodução microbiana. A levedura utiliza de reservas de glicogênio, e o oxigênio dissolvido no mosto, para multiplicação por meio da formação de ergosterol importante componente da membrana celular (MONTENEGRO, 2017; PAIXÃO, 2018; SILVA FILHO, 2019). Nesta fase de transição haverá aumento gradual da velocidade de reprodução e da velocidade específica de crescimento (μ). No fim da fase de transição, a população inteira começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo (ALTERTHUM, 2020).

Na fase logarítmica ou de crescimento exponencial, haverá conversão dos açúcares presentes no mosto e sem o efeito *Crabtree* da *Saccharomyces* seria priorizado o ciclo respiratório (SILVA FILHO, 2019). Entretanto, as leveduras *Crabtree* positivas como *Saccharomyces cerevisiae*, utilizam a via fermentativa em meios ricos em glicose mesmo em aerobiose. Segundo Pires (2017) isso ocorre devido à inativação da via respiratória pela glicose e não depende da disponibilidade de oxigênio no meio. Em leveduras *Crabtree* positivas a produção de biomassa é baixa, pois uma grande porção do açúcar é convertido em etanol, já leveduras *Crabtree* negativas produzem uma grande quantidade de biomassa a partir da glicose (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Nesta fase, “a velocidade de crescimento é constante e máxima ($\mu = \mu_m$) e está proporcionalmente ligada a concentração celular X” (ALTERTHUM, 2020).

A fase estacionária de crescimento apresenta a velocidade instantânea de reprodução microbiana constante ($r_x = r_k$). Contrária à fase exponencial na fase estacionária a velocidade específica de crescimento não é constante, mas sim diminui com o aumento da concentração celular ao passar do tempo de cultivo (ALTERTHUM, 2020). Para Paixão (2018) “a existência do crescimento linear indica, a presença de certas limitações no transporte de nutrientes à interface microrganismo-meio”, principalmente em organismos filamentosos.

Devido ao esgotamento de um ou mais componentes do meio e o aumento de metabólitos inibidores, a levedura entra na fase de desaceleração, onde as velocidades de crescimento e a velocidade específica diminuem até se anularem (PAIXÃO, 2018; ALTERTHUM, 2020).

Na fase estacionária o crescimento celular está constante e atinge seu valor máximo. As leveduras podem permanecer em fase estacionária durante semanas ou meses, ocorrendo indução da síntese de açúcares de reserva como o glicogênio e a trealose e reestruturação da parede celular, até atingirem a fase de declínio. Por fim, as leveduras entram na fase de declínio ou morte celular, onde a concentração celular em uma velocidade maior que a velocidade de produção de novas células, a lise celular é provocada por enzimas intracelulares (PIRES, 2017; ALTERTHUM, 2020).

3.4 Agente fermentativo - diversidade de *Saccharomyces* e sua história evolutiva

Leveduras são fungos unicelulares classificadas como eucariontes pertencentes ao Reino Fungi. Estão presentes nos Filos dos Ascomycotas e Basidiomycotas, sendo os

ascomicetos que apresentam maior interesse industrial (RIBEIRO *et al.*, 2018a; RIBEIRO *et al.*, 2018b).

As leveduras em geral se reproduzem de maneira assexuada, majoritariamente. Porém, podem se reproduzir de forma sexuada e assexuada, em diferentes contextos. Segundo Ribeiro *et al.*, (2018b),

Quando se trabalha com meio de cultura relativamente rico em nutrientes, como nas fermentações industriais, a reprodução é realizada por processo assexuado, isto é, a multiplicação das leveduras ocorre por brotamento ou gemulação, do qual resultam células filhas, inicialmente menores que a célula-mãe. O processo sexuado pode ocorrer quando as condições do meio de cultivo se tornam extremamente desfavoráveis ao seu desenvolvimento. A reprodução sexuada se faz pela formação de ascósporos, isto é, esporos contidos no interior de um asco (RIBEIRO *et al.*, 2018b, p. 79).

A morfologia das leveduras pode apresentar formato esférico, elíptico ou filamentosos. Seu tamanho pode variar de 1 µm a 5 µm de diâmetro e de 5 µm a 30 µm de comprimento (ALTERTHUM, 2020).

O gênero *Saccharomyces* é composto por dez espécies, as espécies *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* e *S. paradoxus* formam o grupo *Saccharomyces sensu stricto* sendo as duas primeiras de principal interesse na produção cervejeira. As espécies *S. exiguus*, *S. castelli*, *S. servazzi* e *S. unisporus* formam o segundo grupo *Saccharomyces sensu largo*. A espécie *S. kluyveri* é o terceiro grupo (SILVA, 2009).

Em 1923 Henry Boulard isolou uma cepa de levedura da lichia e mangostão após observar nativos na Indochina (ALTMANN, 2017). Sem diferenciação taxonômica a *S. cerevisiae* var. *boulardii* é classificada como um subtipo de *S. cerevisiae* (SANNINO *et al.*, 2019).

A levedura *S. cerevisiae* var. *boulardii* é uma levedura não patogênica, muito utilizada como fármaco para tratamento e prevenção de doenças gastrointestinais como diarreias por ingestão de antibióticos, síndrome do intestino irritável e doenças e infecções causadas por bactérias como *Escherichia coli* ou *Clostridium difficile* (LAZO-VÉLEZ *et al.*, 2018; SENKARCINOVA *et al.*, 2019).

A levedura *S. cerevisiae* var. *boulardii* apresenta fermentação adequada na conversão dos açúcares em etanol e CO₂, com a mesma produção de glicerol de levedura convencional. A levedura *S. boulardii* apresenta preferência por glicose como fonte de carbono, e sob condições de estresse, como falta de substrato, intensifica a produção de ácido acético não desejável por deixar sabor amargo na cerveja. De Paula *et al.* (2021),

encontraram resultados satisfatórios sobre a resistência da levedura adicionada em bebida fermentada em condições do trato gastrointestinal.

Senkarcinova *et al.* (2019) estudou a influência das variáveis temperatura, concentração de etanol e a presença de iso- α -ácidos na taxa de crescimento específico da levedura *S. boulardii*, esclarecendo importantes variáveis para a produção de cerveja. A levedura apresenta maior taxa de crescimento em temperaturas mais altas, cerca de 30°C, quando comparado a taxa de crescimento a 2°C. O aumento da concentração de etanol e iso- α -ácidos impactou significativamente a taxa de crescimento. Mendonça (2021) em seu estudo para produção de cerveja estilos *Pilsen*, *Indian Pale ale* e *Belgian Golden Strong Ale* fermentadas com *S. boulardii* observou que a levedura é capaz de produzir cerveja com baixos teores alcoólicos e potencialmente probióticas após cálculos de ingestão diária de etanol.

4 MATERIAL E METÓDOS

A produção foi realizada em propriedade particular no município de São Lourenço do Oeste – SC e as análises foram conduzidos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Francisco Beltrão no laboratório de química e no laboratório de análise sensorial da Coordenação de Estação Experimental (COEXP) e na Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Pato Branco no laboratório de química.

Para a produção foi utilizado kit cervejeiro artesanal composto de duas painelas em aço inoxidável com capacidade de 40 litros, um filtro tipo bazooka em aço inoxidável 304, dois fermentadores de polipropileno com capacidade de 12 litros cada contendo airlock e torneiras em ambos e um *chiller* em alumínio.

Foram desenvolvidas duas formulações de cerveja com variação apenas na levedura utilizada. Na formulação A (padrão) o agente fermentativo foi a levedura *S. cerevisiae* US-05 da marca comercial Fermentis (contém $> 6 \times 10^9$ células viáveis por grama) e na formulação B o agente fermentativo utilizado foi a levedura *S. cerevisiae* var. *bouardii* obtida a partir do medicamento Floratil®, onde cada cápsula contém 200 mg de *Saccharomyces bouardii* - 17 liofilizada (200 mg de levedura liofilizada contém no mínimo 1×10^9 células de *Saccharomyces bouardii* – 17).

4.1 Produção da cerveja

Para a produção de cerveja artesanal estilo *Cream Ale*, 11 litros de água foram aquecidos até que se atingisse 68° C e adicionou-se 3,8 kg de malte, sendo 3,4 kg de malte *BWS Pilsen Belga*, 300g de malte *Castle Malting Chateau Munich* e 100g de malte *Castle Malting Chateau Cara Gold*. Após a adição do malte a temperatura do mosto diminuiu para 65°C e deu-se início a etapa de sacarificação. Passados 60 min, foi realizado o teste de iodo para confirmação de que todo amido foi convertido.

Então realizou-se o *mash-out*, elevando a temperatura para 76°C por 5 min, para inativação enzimática. Esse mosto primário foi acondicionado em um recipiente de fermentação (Figura 3). Após esse processo 16 litros de água aquecidos a 65°C e foram utilizados para lavagem do bagaço de malte restante, e foi adicionado ao recipiente de

fermentação. O mosto secundário com 27 litros foi então transferido para a panela de fervura.

Figura 3 – Esquema de transferência do mosto primário para o recipiente de fermentação, e transferência de água de lavagem para panela contendo bagaço de malte.



Fonte: Autoria própria (2022).

Iniciou-se a etapa de fervura que se perdurou por 60 minutos, no início da fervura foram adicionados 10g de lúpulo *Saphir* para o amargor. Ao fim dos 60 minutos de fervura foram adicionados mais 15g de lúpulo *Saphir* para conferir aroma a bebida.

Ao fim da fervura ocorreu a etapa de *whirlpool*, fase em que houve a sedimentação de partículas suspensas no mosto provenientes da aglutinação de proteínas do malte e precipitação de partículas do lúpulo e também redução leve da sua temperatura.

A redução da temperatura do mosto realizou-se por meio de um *chiller* de imersão. Este esteve imerso na panela que continha o mosto cervejeiro e em seu interior foi circulada água gelada até que a temperatura se aproximasse a 22°C.

Antes da inoculação água e dry malt extract foram solubilizados até densidade de 1,036. Essa solução foi fervida por 5 min e resfriada a 30°C, então inoculou-se ambas as leveduras em frascos diferentes e mantido em agitação por 24 horas (MENDONÇA, 2021)

O mosto cervejeiro foi transferido para os recipientes de fermentação gerando um volume de 9 litros em cada fermentador, onde no primeiro recipiente foi transferida a levedura *S. cerevisiae* US-05 inoculada anteriormente na proporção de 0,55g por litro de mosto para a formulação padrão, no segundo balde foi transferida a levedura *S. bouldardii* em sua forma comercial inoculada anteriormente, proveniente do medicamento Floratil® na proporção de 0,66g por litro de mosto (Figura 4).

Figura 4 – Fermentação das cervejas.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A fermentação foi conduzida a temperatura de 17°C por 2 dias, e a 20°C por 10 dias até atenuação completa do mosto. O acompanhamento desta etapa ocorreu por meio da mensuração da densidade do mosto até atingir densidade 1,010 para a formulação padrão e 1,016 para a formulação com a levedura *S. cerevisiae* var. *bouldardii*, por 3 dias consecutivos. Ao fim da fermentação, a cerveja maturou por mais 10 dias em temperaturas de 0°C.

Após este período a cerveja foi transferida para outro fermentador para não ocorrer arraste de *trub* no envase, foi adicionado o *priming* no fermentador na proporção de 7g.L⁻¹ de cerveja com a finalidade de carbonatar a cerveja. O envase aconteceu em

garrafas de vidro âmbar com capacidade de 300 mL, estas permaneceram em repouso por mais 30 dias em temperatura ambiente média de 16°C para completar a carbonatação (2ª fermentação).

4.2 Caracterização físico-química das cervejas produzidas

Para realização das análises de caracterização físico-química, a cerveja precisa previamente ser descarbonatada. Para remoção do CO₂ a amostra foi agitada em agitador magnético durante 5 minutos (IAL, 2008; BORTOLETTO; GOMES, 2020).

4.2.1 Análise de pH

A determinação do pH ocorreu por leitura direta em pHmetro, com calibragem utilizando padrões de pH 4 e 7 de acordo com o método descrito em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.2.2 Determinação do amargor

O amargor característico da cerveja é proveniente de alfa e beta ácidos, a quantificação do amargor em Unidades Internacionais de Amargor (IBU) foi realizada por método espectrofotométrico EBC 9.8 (Analytica, 2020), após extração dos ácidos por solvente (se. Em um tubo de ensaio para centrifugação foram adicionados 10 mL da cerveja descarbonatada, 1 mL de ácido clorídrico (HCl 3 mol. L⁻¹) e 20 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano). A amostra passou por agitação mecânica por 15 minutos a 130 rpm, e posteriormente foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma cubeta para mensurar a absorbância com o auxílio de espectrofotômetro a um comprimento de onda de 275 nm. O padrão de referência utilizado foi iso-octano puro. O amargor em IBU foi obtido pela equação 1,

$$\text{absorbância} * 50 = \text{IBU} \quad (1)$$

4.2.3 Determinação de cor

Para a caracterização da cerveja quanto a cor foi utilizado método espectrofotométrico. As amostras descarbonatas foram filtradas em papel filtro de membrana, posteriormente foi realizada a leitura da absorvância em um comprimento de onda de 430 nm, utilizando água ultra pura como branco, em espectrofotômetro. Para representar os resultados em EBC, a absorvância a 430 nm foi multiplicada por 25 (European Brewery Convention, 2005 *apud* TOZETTO, 2017, p. 38).

4.2.4 Determinação do teor alcoólico

4.2.4.1 Álcool em volume

Para um conjunto de destilação transferiu-se 100 mL de cerveja descarbonatada, juntamente com 2 gotas de álcool octílico. $\frac{3}{4}$ do volume inicial foram recolhidos em balão volumétrico de 100mL, contendo 10 mL de água, acrescentou-se mais água destilada no final da destilação para completar o volume total do balão volumétrico. Após a destilação, com o auxílio de um picnômetro, a densidade relativa foi determinada. Por meio da tabela presente no Anexo A foi realizada a conversão em porcentagem de álcool em volume (IAL, 2008).

4.2.4.2 Álcool em peso

Baseado no método 247/IV para cervejas do Instituto Adolfo Lutz, o álcool em peso foi determinado através de conversão por meio de tabela da densidade relativa, obtida no item 4.2.4.1 deste trabalho. A tabela utilizada para conversão está disposta no Anexo B (IAL, 2008).

4.2.5 Determinação do extrato real

O extrato real foi determinado por meio da conversão da densidade relativa do resíduo de destilação de 100 mL da amostra. Baseado no método 249/IV do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A tabela utilizada para conversão da densidade relativa em extrato real está disposta no Anexo C.

4.2.6 Determinação de extrato aparente

O extrato aparente é determinado por meio da conversão da densidade relativa diretamente da amostra filtrada, por meio da tabela que se encontra no Anexo C (IAL, 2008).

4.2.7 Determinação de extrato original

O extrato primitivo é uma medida da concentração (% p/p) de sólidos (açúcares, dextrinas, proteínas) presentes no mosto antes da fermentação, é uma importante característica para classificação da cerveja. Para determinação do extrato primitivo foi utilizado a fórmula de Balling, descrita na equação 3,

$$\frac{[(P * 2.066) + Er] * 100}{[100 + (P * 1.066)]} = \text{extrato primitivo em \%p/p} \quad (3)$$

sendo P = % de álcool em peso, obtido por meio da densidade relativa. E Er = % de extrato real (IAL, 2008).

O álcool em peso foi obtido no item 4.2.4.2 deste trabalho por meio de tabela contida no Anexo B.

4.2.8 Determinação da turbidez

A determinação de turbidez seguiu método descrito por Mafra (2018), utilizando de um turbidímetro previamente zerado com água destilada, foi efetuada a leitura das amostras em NTU. Para transformação em EBC foi utilizada a equação 4,

$$\text{Turbidez (EBC)} = \text{NTU} * 4 \quad (4)$$

4.3 Caracterização de compostos bioativos

4.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, baseado em Swain and Hillis (1959, apud Galli *et al.*, 2016). Em tubos Falcons de 15 mL, adicionou-se 100 µL de amostra descarbonatada, 400 µL de água destilada, 2,5 mL de Folin-Ciocalteu 10%. Após 5 minutos em repouso, 2 mL de Na₂CO₃ 4% foram adicionados. A solução foi agitada em vórtex até solubilização e permaneceu em repouso por 2 horas ao abrigo da luz, posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 745 nm. Para descontar possíveis interferentes, uma prova em branco também foi realizada, substituindo a amostra por 100 µL de água destilada. O ácido gálico foi utilizado como padrão em concentrações que variaram de 0 a 250 µg. mL⁻¹ para construção da curva padrão que gerou a equação da reta utilizada no desenvolvimento dos cálculos, os resultados foram expressos em mg de Ácido Gálico equivalente (E_{AG}) por mL de cerveja.

4.3.2 Determinação de flavonoides totais

A metodologia para determinação de flavonoides, composto da classe dos fenólicos foi descrita e adaptada por Park *et al.* (1995) e Singh *et al.* (2018). Em tubos Falcons de 15mL para preparar a solução amostra, foram adicionados 500 µL de amostra, 4,3 mL de água destilada, 100 µL de nitrato de alumínio 10% e 100 µL de acetato de potássio 1M. Após 40 minutos de reação, a absorbância da solução foi lida no comprimento de onda 415nm. Para preparar a solução amostra-branco em tubos Falcons de 15mL foram adicionados 500 µL de amostra, 4,4 mL de água destilada, 100 µL de acetato de potássio 1M. Após 40 minutos de reação a solução foi lida em comprimento de onda 415nm.

Para eliminar possíveis interferentes das soluções utilizados, foi realizada leitura dos brancos. O branco da amostra foi preparado utilizando 4,9 mL de água destilada e 100 µL de acetato de potássio. O branco da amostra-branco foi preparado utilizando 4,8 mL de água destilada, 100 µL de acetato de potássio e 100 µL de nitrato de alumínio 10%.

As leituras de absorvância foram utilizadas na equação da reta para determinar o potencial antioxidante. Para obtenção da equação da reta, a quercetina foi utilizado como padrão em concentrações que variaram de 0 a 150 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em mg de quercetina equivalente (E_{QC}) por mL de cerveja.

4.3.3 Determinação da atividade antioxidante

4.3.3.1 Método DPPH

A atividade antioxidante total da bebida foi determinada baseando-se no método do DPPH descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995; apud Galli *et al.*, 2016). O método consiste na adição de 200 μL da amostra, 2,8 mL de etanol P.A e 500 μL de DPPH 0,5 mM em seguida permaneceu em repouso na ausência de luz por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, comprimento de onda de 517 nm. A solução de Trolox foi utilizada como padrão em concentrações que variaram de 0 a 200 μM para construção da curva de calibração, os dados foram apresentados como mmol de equivalente Trolox por mL da cerveja (mM TE. mL^{-1}).

Para eliminar possíveis interferentes decorrentes da coloração da solução de DPPH, foi realizada a leitura no mesmo comprimento de onda de uma solução branco que foi preparada utilizando 3,3mL de etanol e 500 μL de DPPH 0,5 mM.

4.3.3.2 Método FRAP

Para determinação de atividade antioxidante pelo método FRAP, a amostra precisou ser diluída 5x. Logo, 1 mL de amostra foi adicionado a 4 mL de água destilada formando o que chamamos de extrato. 90 μL de extrato foram transferidos para tubo Falcon de 15mL onde foram adicionados 270 μL de água destilada e 2,7 mL de solução do reagente FRAP que foram homogeneizados em vórtex. Essa solução ficou em repouso em banho-maria a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Para eliminar possíveis interferências foi realizada a leitura de um branco, que foi preparado utilizando 360 μL de água destilada e 2,7 mL de solução do reagente FRAP.

A curva padrão foi construída utilizando sulfato ferroso 2mM como reagente padrão, em concentrações que variaram de 0,1 a 2 mM. Os resultados foram expressos em $\text{mmol Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.3.3.3 Método ABTS

A determinação da atividade antioxidante por ABTS (2,2' azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]) foi baseado no método desenvolvido por Re *et al.* (1999). A preparo do radical ocorreu pela reação de 5mL ABTS 7mM com 88 μ L de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 140 mM, essa solução foi mantida ao abrigo da luz por 16 horas em temperatura ambiente. Passado esse tempo a solução ABTS* foi diluída com etanol P.A até obter absorvância de 0,70 a 734 nm.

Para determinação das amostras, 30 μ L foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL juntamente com 3,0 mL de solução de ABTS* corrigida. A solução foi homogeneizada em vórtex e mantida ao abrigo de luz por 6 minutos, as leituras foram realizadas a 734 nm, utilizando etanol para zerar o espectrofotômetro. Para eliminar possíveis interferências foi realizada a leitura de um branco, que foi preparado utilizando 30 μ L de etanol e 3,0 mL de solução de ABTS*. A curva padrão foi construída utilizando solução de Trolox como reagente padrão, em concentrações que variaram de 0 a 1500 μ M. Os resultados foram expressos em mMTE. mL^{-1} .

4.4 Análise sensorial

A análise sensorial ocorreu em 3 etapas, inicialmente houve a seleção da equipe, posteriormente foi utilizado o método de rede para levantamento de atributos e por fim as cervejas foram avaliadas utilizando a análise descritiva Perfil Livre *Flash*. A ficha utilizada para a análise está disposta no Anexo D.

4.4.1 Seleção de julgadores

Foram recrutados 40 voluntários que eram produtores e/ou consumidores frequentes da bebida para compor a equipe de avaliadores. Para seleção utilizou-se os testes recomendados pela ISO 8586 (ABNT, 2016), com adaptações dos testes utilizados

por Dutcosky (2013), foram utilizados os testes de identificação dos estímulos de gostos e sensações e teste de níveis de intensidade de um estímulo. Para o teste de identificação de *off flavours* da cerveja foi utilizado o kit sensorial de *off flavours* da Brau Flavors, que são adquiridos em frascos de 5mL que devem ser diluídos em 1L de cerveja.

Para o teste de identificação de estímulos, inicialmente foram apresentadas as amostras preparadas conforme Tabela 1, devidamente identificadas para familiarização dos gostos e sensações.

Tabela 1 – Materiais e concentrações utilizadas para teste de identificação de estímulos.

Gosto ou sensação	Material	Concentração em água (g.L ⁻¹)
Doce	Sacarose	10
Ácido	Ácido cítrico	0,3
Amargo	Cafeína	0,3
Salgado	Cloreto de sódio	2
Umami	Glutamato monossódico	0,6
Adstringente	Sulfato de alumínio e potássio	0,5
Metálico	Sulfato ferroso hepta-hidratado	0,01

Fonte: Dutcosky (2013) e ABNT (2016).

Posteriormente, as mesmas soluções apresentadas no Quadro 1 foram disponibilizadas codificadas aos julgadores e foi solicitado que fossem identificadas.

Para o teste discriminativo para níveis de intensidade de estímulo para gosto, foi realizado um teste de ordenação onde quatro amostras preparadas com diferentes concentrações de ácido cítrico foram apresentadas codificadas e em ordem aleatória. As concentrações utilizadas foram 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 g.L⁻¹ e para os julgadores foi solicitado que ordenassem em ordem crescente de intensidade.

Para o teste de identificação de *off flavours* na cerveja foram utilizados os odores de diacetil, descrito como manteiga ou caramelo; acético, descrito como vinagre; Sulfítico, descrito como tempero alho ou cebola; DMS, descrito como vegetais cozidos; Acetato de isoamila, descrito como frutado ou removedor de unhas e gramíneo, descrito como grama cortada.

Foram selecionados aqueles que obtiveram 100% de acertos no teste de identificação dos estímulos de gostos básicos e sensações, 100% de acerto no teste discriminativo para detecção de intensidade de estímulo e no mínimo 50% de acerto para teste de identificação de *off flavours* de cervejas.

4.4.2 Levantamento de atributos

Para o levantamento de atributos seguiu-se o método de rede descrito por Dutcosky (2013). Duas amostras foram apresentadas aos avaliadores, a amostra padrão e uma cerveja comercial, para que fossem listadas as diferenças e semelhanças entre elas. Todos os atributos levantados foram compilados em uma lista, e enviado a todos os participantes por meio de aplicativo multiplataforma de mensagens instantâneas para discussão de quais termos iriam compor a ficha de análise. Para aumentar o consenso entre julgadores, a ficha de análise foi composta em conjunto e utilizando os mesmos termos para todos os julgadores, seguindo o procedimento realizado por Gouton *et al.* (2021) para análise de *cookies* em realidade virtual. Os termos levantados e as devidas descrições estão dispostos no Anexo E.

4.4.3 Perfil Livre *Flash*

Após o levantamento dos atributos e definição de que termos comporiam a ficha de análise foi aplicada a técnica de Perfil Livre *Flash*. Para realização desse método, foram apresentadas 5 amostras de cervejas, sendo elas: a cerveja padrão, a cerveja produzida com a levedura não convencional e três cervejas comerciais, dos estilos *Blond Ale*, *American Pale Ale* e *Weiss*, levando em conta a utilização de leveduras de alta fermentação (Figura 5). Foi solicitado que os julgadores ordenassem as 5 amostras de acordo com a intensidade dos atributos avaliados, sendo 5 a amostra com maior intensidade, 3 a amostra intermediária e 1 a amostra com menor intensidade. A ficha utilizada para esta última etapa está disposta no Anexo F.

Figura 5 – Amostras de cervejas codificadas utilizadas durante análise sensorial



Fonte: Autoria própria, 2022.

Nesta etapa era possível que o julgador alterasse os atributos avaliados, caso sentisse dificuldade para percepção do atributo ou se o atributo não representasse as amostras em questão.

A análise sensorial descritiva Perfil *Flash* ou Livre é baseada no princípio de que cada indivíduo descreve diferentes termos ou descritores para uma amostra, mas a percepção e a sensação são as mesmas.

A pesquisa teve certificação do Comitê de Ética em Pesquisa que envolve seres humanos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR), com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 50428121.6.0000.0177. A participação só foi possível mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) disponível no Apêndice D.

4.5 Análise estatística

A análise estatística para as análises físico-químicas e de compostos bioativos foi realizada utilizando o programa computacional SAS system for Windows versão 9.4. Os dados foram submetidos a análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, foram comparados os efeitos das leveduras utilizadas pelo teste t ($p \leq 0,05$).

A análise sensorial foi tratada estatisticamente por meio da Análise Procrustes Generalizada empregando software estatístico XLSTAT versão 2020.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados físico-químicos da cerveja

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas das cervejas produzidas estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas das cervejas produzidas

Parâmetros	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulandii</i>	Literatura	Referência
Álcool % v/v (ABV)	4,59*	3,76	4,2 a 5,6	(BJCP, 2021).
Extrato Real (°P)	4,19*	5,59	...	
Extrato Aparente (°P)	2,46*	4,11	2,43	(SILVA; SOUZA; PINHEIRO, 2021).
Extrato Original (°P)	11,14*	11,17	> 5%	(BRASIL, 2019).
pH	4,36*	4,45	< 4,5 %	(MENDONÇA, 2021)
Cor (EBC)	12 ^{ns}	12	7	(FERREIRA, 2019)
Amargor (IBU)	15*	12	8 a 20	(BJCP, 2021)
Turbidez (EBC)	23,4*	46,8	6,6 a 25,34	(SILVA; SOUZA; PINHEIRO, 2021).

* e ^{ns} representam, respectivamente, significativo e não significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) entre as leveduras utilizadas para elaboração das cervejas.

Fonte: Autoria própria (2022).

Segundo os dados apresentados na tabela 2 houve diferença significativa dos atributos entre as cervejas produzidas, exceto para cor que apresentou mesmo valor para ambos os tratamentos.

Para este estilo de cerveja americana, segundo o guia de estilos *Beer Judge Certification Program* (BJCP, 2021), a porcentagem de álcool ABV deve estar entre 4,2 e 5,6. A cerveja padrão manteve o esperado para o estilo, enquanto a cerveja produzida com a levedura não convencional apresentou teor alcoólico abaixo do mínimo. Pelos altos valores de extrato real e extrato primitivo na Formulação B, que foi a cerveja fermentada com *S. boulandii*, era esperado o baixo teor alcoólico, pois houve menor consumo de açúcar durante o processo fermentativo. Os dados corroboram com o que avaliou

Mendonça (2021), que encontrou baixos valores de teor alcoólico, entre 3,08 a 3,44, em cervejas fermentadas com *S. bouldarii* dos estilos *Pilsen*, *Indian Pale Ale* e *Belgian Golden Strong Ale*, respectivamente. Silva, Souza e Pinheiro (2021) avaliaram a influência da imobilização de leveduras sobre a qualidade físico-química e variáveis de bioprocessos, e encontraram valores de 4,93 % (ABV) para a cerveja produzida com células livres de *S. cerevisiae* US-05. Em cerveja fermentada com *starters* mistos de levedura convencional e *S. bouldarii*, Capece *et al.* (2018) encontraram valores de teor alcoólico entre 3,04 e 5,72 % (ABV). No entanto, na cerveja fermentadas apenas com a *S. bouldarii* o teor encontrado foi de 3,93 % (ABV), muito próximo ao observado no presente trabalho.

O extrato real está relacionado a todos os sólidos presentes na cerveja após a fermentação, como açúcar e proteínas, corrigindo com o teor de álcool, sensorialmente quanto maior o extrato real, mais encorpada será a cerveja. O extrato aparente está relacionado a quantidade de extrato ou sólidos durante a fermentação, sem correção por conta do conteúdo alcoólico. Já o extrato primitivo, pela legislação é a quantidade de extrato no mosto ‘que deu origem a cerveja’ e esse valor deve ser superior a 5,0% em peso. Esses parâmetros são importantes para avaliar a disponibilidade de substrato para a levedura e a produção de etanol, considerando que esses extratos são basicamente formados por açúcares (BRASIL, 2019; DE PAULA, 2019; MENDONÇA, 2021).

Para uma cerveja *Cream Ale* utilizando células livres de *S. cerevisiae*, Silva, Souza e Pinheiro (2021) encontraram dados de 2,43°P de extrato aparente, inferior a 2,46 e 4,11 encontrado no presente trabalho. A cerveja fermentada com *S. bouldarii* apresentou diferença significativa em comparativo a formulação padrão, esse valor maior pode indicar que a levedura consome menor quantidade de açúcares e explica também o baixo teor alcoólico.

O pH é uma importante ferramenta de controle microbiológico na cerveja, altos valores de pH não são desejáveis. No presente estudo, os dados de pH apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, mas se manteve abaixo de 4,5, onde o controle bacteriostático ainda é eficiente. A diferença entre os tratamentos pode estar relacionada ao metabolismo da levedura *S. bouldarii* durante o processo fermentativo, diminui-se o consumo de substrato conseqüentemente diminui-se a formação e a excreção de ácidos orgânicos (MENDONÇA, 2021).

Não houve diferença significativa de cor entre os tratamentos, possivelmente por ser um parâmetro interligado principalmente ao malte utilizado e a torrefação. Ferreira

(2019) descreveu cor de 7,0 EBC para a cerveja estilo *Cream Ale* fabricada apenas com malte *Pilsen*, diferente deste trabalho onde foi adicionado maltes *Castle Malting Chateau Munich e Castle Malting Chatea Cara Gold* que possuem maior grau de torrefação, onde a cor mensurada foi de 12 EBC.

Segundo o guia de estilos BJCP (2021), o amargor em cervejas *Cream Ale* devem estar entre 8 e 20 IBU, ambas cervejas produzidas nesse estudo se encontram dentro dessa faixa. Como foi utilizado o mesmo lúpulo nas duas formulações e em iguais concentrações, a diferença significativa no amargor da cerveja pode estar relacionada a isomerização de iso- α -ácidos durante a fermentação (SILVA; FARIA, 2008).

Silva, Souza e Pinheiro (2021) encontraram valores entre 6,6 a 25,34 EBC de turbidez para cerveja *Cream Ale* fermentada com *S. cerevisiae* com células livres e imobilizadas, sendo próximo ao valor encontrado para a cerveja padrão do presente estudo. A formulação B apresentou turbidez 2 vezes maior que a formulação padrão, que pode estar relacionado a atenuação da levedura não convencional e a presença de leveduras em suspensão, que pode ser evidenciado pelo sutil aroma de fermento detectado na análise sensorial da bebida. Loser (2017) também identificou a diferença na floculação e sedimentação da levedura de 65 a 70% quando comparada a cervejas produzidas com levedura convencional.

5.2 Compostos bioativos

A quantificação dos compostos bioativos presentes nas cervejas produzidas está apresentada na tabela 3, no presente estudo não houve caracterização desses compostos.

Tabela 3 – Resultados das análises realizadas para compostos bioativos.

(continua)

Parâmetros	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Literatura	Referência
Compostos fenólicos totais (mg E _{AG} . L ⁻¹)	861,5 ± 0,01 ^{ns}	915,7 ± 0,06	272,7 a 304,1	(FILHO et al., 2021).
Compostos flavonoides totais (mg E _{QC} . L ⁻¹)	3,5 ± 0,00*	6,4 ± 0,00	...	

Parâmetros	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Literatura	Referência
Atividade antioxidante – método DPPH (mmol TE. L ⁻¹)	66,5 ± 0,01*	84,6 ± 0,01	0,8 e 0,58	(FILHO et al., 2021).
Atividade antioxidante – método FRAP (mmol Fe ²⁺ . L ⁻¹)	2405,8 ± 0,03*	2547,5 ± 0,04	342,64 e 423,00	(FILHO et al., 2021).
Atividade antioxidante – método ABTS (mmol TE. L ⁻¹)	921,8 ± 0,03 ^{ns}	899,8 ± 0,02	1850,83 a 2489,58	(VIEIRA et al., 2021)

* e ns representam, respectivamente, significativo e não significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) entre as leveduras utilizadas para elaboração das cervejas.

Fonte: Autoria própria (2022).

Dentro da grande variedade de compostos fenólicos, os mais estudados para a cerveja são os ácidos fenólicos. O ácido gálico é um ácido fenólico natural e alguns de seus efeitos biológicos podem estar associados à atividade anticancerígena (HANCK-SILVA, 2021).

Os valores obtidos para CFT neste estudo não apresentaram diferença significativa entre as leveduras utilizadas. Em ambas cervejas os resultados encontrados foram superiores aos obtidos em cervejas *Red Ale* produzidas com levedura *S. cerevisiae* M07 e adição de especiarias com compostos antioxidantes, onde os teores variaram de 272,7 a 304,1 mg E_{AG}. L⁻¹ (FILHO et al., 2021). Viana et al. (2021) em seu trabalho realizaram a quantificação de CFT em cerveja estilo *American Pale Ale*, utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae*, onde 18 compostos foram quantificados, entre eles o principal ácido fenólico encontrado foi o ácido clorogênico em concentrações entre 1,08 a 2,21 mg.L⁻¹. Não foram encontrados dados na literatura de quantificação de compostos bioativos para o estilo *Cream Ale* em específico, mas de acordo com Filho et al. (2021) e Silva, Dias e Koblitz (2021) cervejas do tipo *ale* apresentam teores maiores de CFT devido a utilização de maltes com maior torrefação e a maior coloração da cerveja.

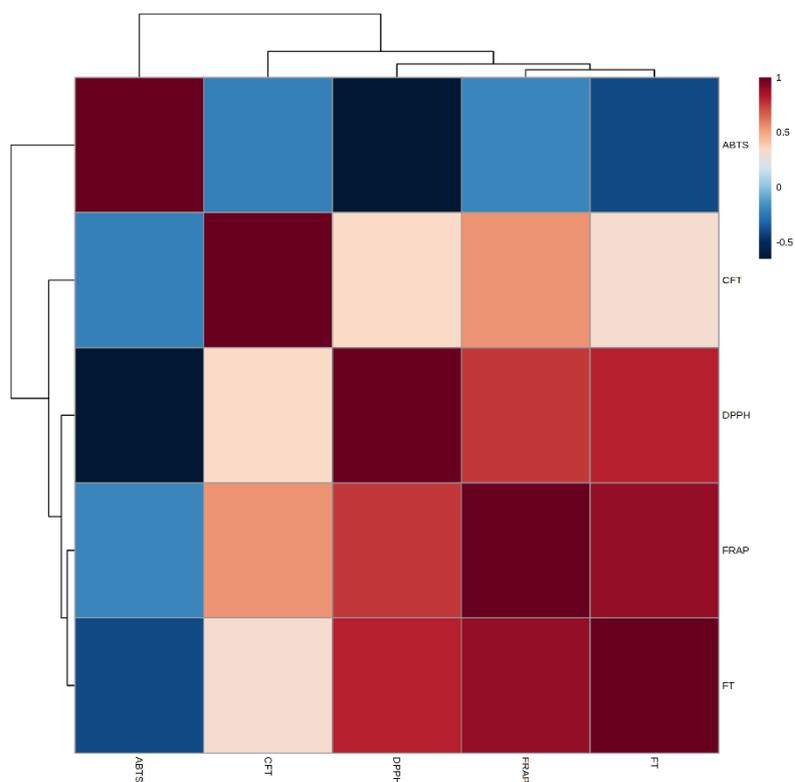
Os teores de flavonoides totais foram significativamente maior na cerveja produzida com a levedura não convencional *S. boulardii* em comparação a cerveja produzida com levedura convencional. Capece et al. (2018) descobriram um aumento na atividade antioxidante e no teor de polifenóis quando fermentaram a cerveja com *starters* mistos com levedura *S. boulardii*, em comparação com fermentações com cepas simples.

Farinazzo *et al.* (2021) estudaram a influência da levedura *S. boulardii* na cinética de fermentação de polpa de maçã e o efeito antioxidante da quercetina, e concluíram que a própria levedura é mais resistente a agentes oxidantes e em conjunto com a quercetina pode aumentar a biodisponibilidade e a atividade antioxidante da polpa de maçã.

O estudo da atividade antioxidante das cervejas foi realizado pelos métodos DPPH, que avalia o poder de redução de radicais livres pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil); pelo método de captura de radicais de ABTS (2,2' azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]) e pelo método de redução do íon férrico FRAP. Nos métodos DPPH e FRAP pode-se detectar a influência significativa da levedura sobre a atividade antioxidante das cervejas. Já no método ABTS não foi possível detectar diferença significativa na atividade antioxidante das cervejas.

Pelo gráfico da correlação de Pearson (Figura 6) é possível observar forte correlação entre os teores de flavonoides com a atividades antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP ($r > 0,85$), o que pode indicar que a atividade antioxidante da cerveja está atrelada majoritariamente ao conteúdo de flavonoides e não a outros compostos fenólicos.

Figura 6– Gráfico de correlação de Pearson



Fonte: Autoria própria (2022)

Filho *et al.* (2021) encontraram valores entre 0,8 e 0,58 mmol TE.L⁻¹ de atividade antioxidante pelo método DPPH, e valores entre 342,64 e 423,00 mmol TE.L⁻¹ para o método FRAP em cerveja *Red Ale* com levedura convencional, valores menores que os encontrados no presente estudo. A atividade antioxidante de cervejas fermentadas utilizando *starters* mistos com *S. boulardii* apresentou valores de DPPH entre 0,42 a 4,12 mmol TE.L⁻¹, o que mostra que o uso de *S. boulardii* como única cepa aumenta em até 6x o poder redox.

Vieira *et al.* (2021) em seu estudo sobre a atividade antioxidante de cervejas de trigo encontraram valores que variaram de 1850,83 a 2489,58 mmol TE.L⁻¹ para o método ABTS que superam os obtidos neste estudo. Estes valores indicam a grande influência do uso de trigo na atividade antioxidante de cervejas.

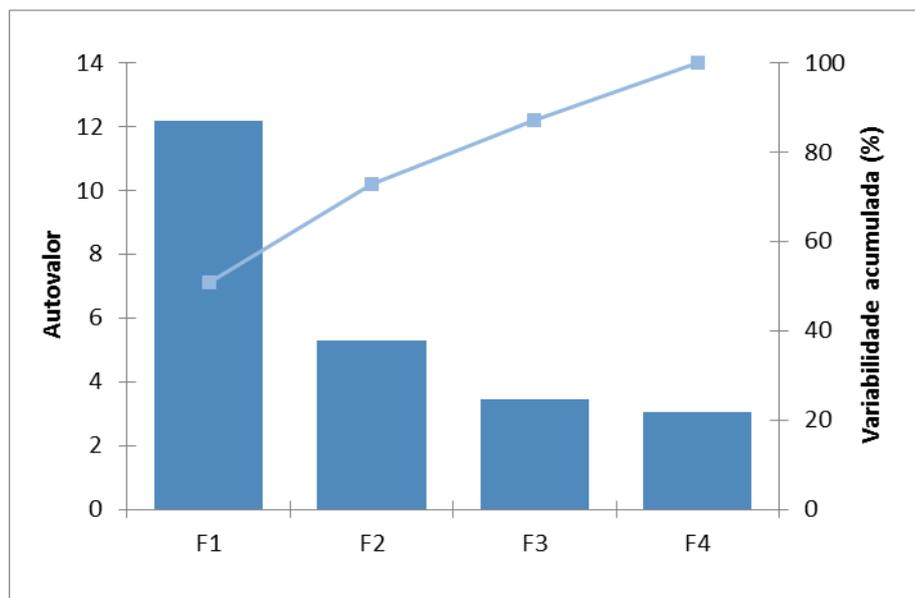
5.3 Análise sensorial

A equipe foi composta por 19 julgadores, sendo 12 homens e 7 mulheres com idades entre 21 e 44 anos.

O número de atributos levantados pelo método de rede e que compuseram a ficha de análise foram 13. Para aparência foram utilizados os atributos formação de espuma, persistência de espuma, cor e turbidez. Para o aroma foram utilizados os termos de aroma de lúpulo e aroma de levedura. Para o sabor os atributos foram ácido, amargo, doce, refrescante, sabor residual de cerveja e carbonatação e para a textura foi avaliado o atributo densidade ou encorpada.

Araújo (2019) utilizou o método *Check-All-That-Apply* para caracterização sensorial e levantou 20 principais descritores para a bebida entre eles, o cítrico associado ao amargor do lúpulo, ácido, adocicado e refrescante. Araújo, Silva e Minim (2003) também utilizaram os termos descritivos cor, aroma de levedura, sabor doce, sabor amargo e carbonatação. Logo, os atributos avaliados são comumente utilizados para descrição sensorial de cerveja, estando em conformidade com a literatura.

Para a análise das cervejas a maioria dos atributos citados apresentou alta correlação em uma solução bidimensional explicação de mais de 70%, como observado na Figura 7. Portanto, considerou-se satisfatória a representação das bebidas em duas dimensões.

Figura 7 – Autovalores e variação dos atributos explicada em cada dimensão

Fonte: Autoria própria (2022).

Na dimensão 1, as maiores correlações observadas positivas e negativas foram formação de espuma, persistência de espuma, cor, aroma de lúpulo, aroma de levedura, sabor ácido, sabor amargo, sabor doce, refrescância e a carbonatação. Na dimensão 2, as correlações positivas e negativas de maior intensidade foram turbidez, sabor residual de cerveja e textura encorpada (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4 – Correlações entre as dimensões da configuração de consenso inicial e os atributos

(continua)

PARÂMETROS	Dimensão 1	Dimensão 2
Formação de espuma	-0,878	-0,459
Persistência de espuma	-0,863	-0,458
Cor	0,858	0,498
Turbidez	-0,119	0,778
Aroma de lúpulo	-0,884	0,290
Aroma de levedura	0,888	-0,059
Sabor ácido	-0,983	0,090

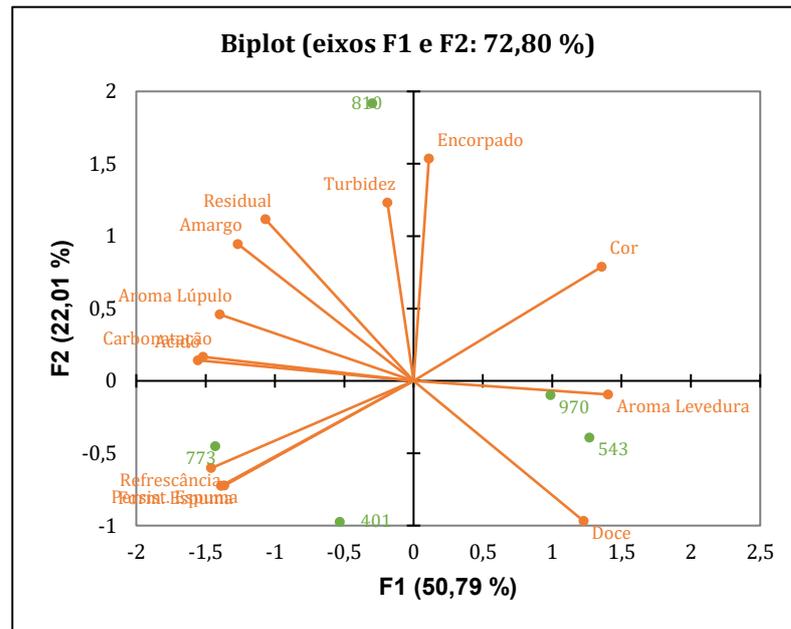
PARÂMETROS	(conclusão)	
	Dimensão 1	Dimensão 2
Sabor amargo	-0,801	0,597
Sabor doce	0,776	-0,613
Refrescância	-0,922	-0,381
Sabor Residual	-0,675	0,705
Carbonatação	-0,959	0,105
Encorpada	0,070	0,970

Fonte: Autoria própria (2022).

A figura 8 apresenta a correlação dos atributos nas duas dimensões e a discriminação das amostras dentro destas duas dimensões. Os atributos que melhor descreveram a cerveja padrão e a cerveja produzida com levedura *boulevardii* (códigos 970 e 543, respectivamente) foram a doçura, o aroma de levedura e a cor. Sendo que ambas cervejas se diferenciaram das cervejas comerciais utilizadas na análise, como mostra também o dendrograma na Figura 8. Os atributos que melhor descreveram a amostra 810 (cerveja comercial estilo *Blond Ale*) foram turbidez, sabor residual, amargor e o corpo da cerveja. Para as amostras 773 e 401 (cervejas comerciais estilo *American Pale Ale* e *Weiss*, respectivamente) os atributos que melhor descreveram foram formação de espuma, persistência de espuma e a refrescância. Os atributos aroma de lúpulo, acidez e carbonatação não obtiveram consenso entre os julgadores, mas foram melhores avaliados nas amostras comerciais.

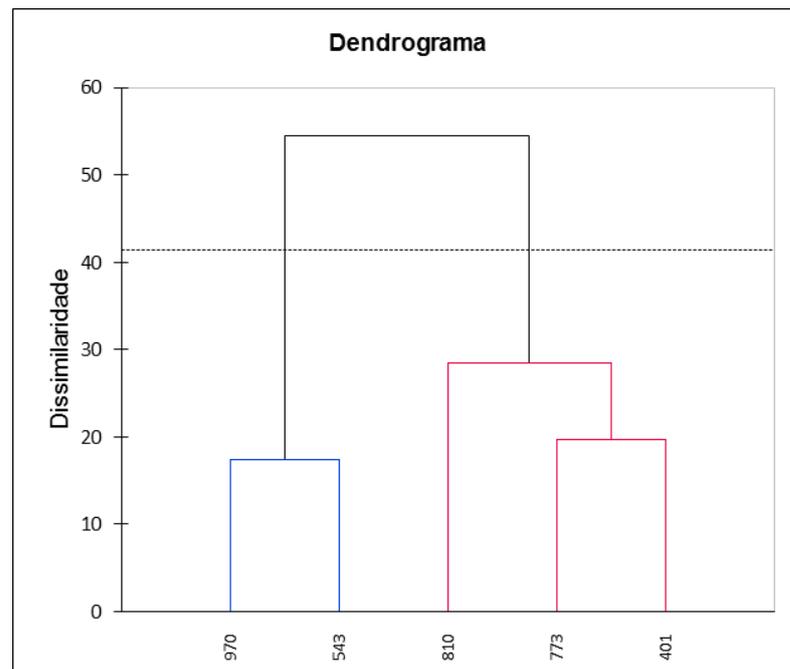
O aroma de levedura presente nas cervejas produzidas foi sutil, mas representa uma possível falha no processo produtivo. Não pode ser indicativo de diferenças da levedura não convencional, pois a levedura padrão apresentou o mesmo aroma. Os vetores de aroma de levedura e carbonatação formam ângulo próximo de 180°C entre si (Figura 8), apresentando uma possível correlação linear negativa, por este motivo a baixa carbonatação das cervejas produzidas tem grande influência na percepção de aroma de levedura.

Figura 8 – Correlação dos atributos nas duas dimensões e coordenadas das amostras.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 9 – Dendrograma de dissimilaridade das cervejas analisadas



Fonte: Autoria própria (2022).

Segundo o guia de estilos da BJCP (2021), o estilo *Cream Ale* apresenta aroma sutil sem dominância de malte ou lúpulo, a cor varia de amarelo palha a ouro moderado, a formação de espuma é de baixa a média, e a carbonatação média a alta com retenção ou persistência razoável. Para o sabor, baixo amargor de lúpulo e baixa a moderada

maltosidade e dulçor, não é o malte e nem o lúpulo que predominam no paladar. Historicamente é uma versão *ale* para competir com as *lagers* que eram muito produzidas no Canadá e Estados do Norte. Resumidamente, é uma cerveja leve e refrescante. Em concordância, a Análise de *Procrustes* Generalizada mostrou que a utilização da *S. Boulardii* como agente fermentador não acarretou grandes diferenças na percepção sensorial da bebida, pois a cerveja padrão apresentou atributos semelhantes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve o intuito de produzir cerveja estilo *Cream Ale* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* como agente fermentador, para avaliar uma possível substituta da levedura convencional para a indústria cervejeira.

A cerveja estilo *Cream Ale* produzida com *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* apresentou diferenças significativas relacionadas a atenuação do mosto como o teor alcoólico e o extrato real, logo a levedura necessita de maior tempo de fermentação e maturação para atingir os padrões de produção alcançados com a levedura *S. cerevisiae*.

Com relação aos compostos bioativos, a cerveja elaborada com *S. boulardii* apresentou valores superiores aos encontrados na literatura indicando o forte apelo de saudabilidade com o consumo da bebida e os possíveis efeitos benéficos com sua ingestão. Os únicos dados encontrados superiores estavam relacionados a cerveja produzida com trigo.

A cerveja fermentada com *S. boulardii* não apresentou diferenças sensoriais significativas em relação a cerveja produzida com *Saccharomyces cerevisiae* convencional, mas ambas demonstraram grandes diferenças quando comparadas a cervejas comerciais. Neste estudo a cerveja foi produzida de forma artesanal o que pode indicar possíveis melhorias para esse processo.

Em trabalhos futuros, utilizando a *S. boulardii* como agente fermentador, seria interessante realizar inicialmente uma avaliação do processo fermentativo e avaliar a produção em maior número de repetições, para garantir se realmente houve falha no processo ou se é característica da bebida o leve odor de levedura. Para utilizar o apelo de saudabilidade relacionado aos compostos bioativos seria interessante estudar seu comportamento durante a *shelf-life* do produto, quando falamos desse apelo voltados aos probióticos em futuros trabalhos é necessário o estudo da quantidade para ingestão, células viáveis e a resistência dessas células ao etanol.

É importante para futuros estudos uma análise econômica da produção com a levedura *S. boulardii* levando em consideração também as possibilidades de replicação.

REFERÊNCIAS

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 8586: Análise sensorial – guia para a seleção, treinamento e monitoramento de avaliadores selecionados e de especialistas ou experts**. Rio de Janeiro, 41 p. 2016.

ABRACERVA. Mercado da cerveja 2018. 2019. Disponível em: <https://conteudo.abracerva.com.br/l/bGNg69ABF1110>. Acesso em: 08 maio 2021.

ALMEIDA, L. K. J. **Acompanhamento do processo de produção da cerveja e elaboração de mapa de risco**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.

ALTERTHUM, F. (org.). **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 2. Ed. São Paulo: Blucher, v. 1, 2020, 462 p.

ALTMANN, M. The Benefits of *Saccharomyces boulardii*. The yeast role in medical applications. **IntechOpen**. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.70591>. Acesso em: 09 maio 2021.

AMARAL, F. S. **Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

ANALYTICA, E.B.C. 9.8—Bitterness of Beer; European Brewery Convention. Hans Carl Getränke-Fachverlag: Nürnberg, Germany, 2020.

ARAÚJO, F. B; SILVA, P. H. A; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200004>. Acesso em: 28 maio 2022.

ARAÚJO, F. R. **Impacto sensorial da microbiota no off-flavour da cerveja artesanal session ipa durante o armazenamento**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

BARBOSA, A. C. *et al.* Development and validation of analytical method for the extraction, identification, and quantification of multi-mycotoxins in beer using a modified QuEChERS procedure and UHPLC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, p. 2135-2148, 2020.

BJCP, Beer Judge Certification Program. Beer style guidelines, 2021. Disponível em: <https://www.bjcp.org/style/2021/beer/>. Acesso em: 01 jun. 2022.

BORTOLETO, G. G.; GOMES, W. P. C. Determinação de compostos orgânicos voláteis em cervejas artesanais por cromatografia gasosa e amostragem por headspace. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. 21, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Anuário da cerveja: 2020. Brasília: MAPA/SDA, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-crescimento-de-14-4-em-2020-numero-de-cervejarias-registradas-no-brasil-passa-de-1-3-mil/anuariocerveja2.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Brasília. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>. Acesso em: 25 abr. 2021.

BREWERS ASSOCIATIONS. Year in beer 2021. **Brewers Association**, 2021. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/year-in-beer/>. Acesso em: 20 abr. 2022.

CAPECE, A. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potencial healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 22-30, 2018.

CHERYL, L. J. *et al.* Incidence and Formation of Petite Mutants in Lager Brewing Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* (Syn. *S. Pastorianus*) Populations. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 67, n. 2, p. 72-80, 2009.

COELHO NETO, D. M. *et al.* Conceitos químicos envolvidos na produção da cerveja: uma revisão. Rio de Janeiro: **Revista Virtual de Química**, v. 20, n.1, p. 120-147, 2020.

DELIBERALLI, C. C. **Cervejas artesanais no Brasil: análise da comunicação integrada de marketing da cervejaria Bodebrown**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em comunicação social) – Setor de Artes, Comunicação e Design, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/43479>. Acesso em: 01 jun. 2022.

DE PAULA, B. R. **Evaluation of technological and functional potential of saccharomyces bouardii for probiotic beers development**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: https://ppgcal.iq.ufrj.br/wp-content/uploads/Tese_Breno-Pereira-de-Paula.pdf. Acesso em: 01 jun. 2022.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013.

DUTRA, V. L. M. **Descrição de cervejas tipo Pilsen por métodos sensoriais rápidos e análises físico-químicas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

FARINAZZO, F. S.; *et al.* Organic and conventional apple fermented by *Saccharomyces bouardii*: the effect of the antioxidant quercetin on cellular oxidative

stress. **British Food Journal**, v. 123, n. 2, p. 520-534. Doi: 10.1108/BFJ-07-2019-0564. Acesso em: 01 jun. 2022.

FERREIRA, L. P. **Análise das cervejas tipo *cream ale*, *pilsen e saison*, segundo as especificações legais**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/15563>. Acesso em: 01 jun. 2022.

FILHO, R. C. N. F.; *et al.* Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: a simplex-centroid mixture design approach. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130478, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130478>. Acesso em: 01 jun. 2022.

FREITAS, C. F. Uma história ilustrada do mercado de cerveja artesanal nos Estados Unidos. **Catalisi**, 26 abr. 2019. Disponível em: <https://catalisi.com.br/uma-historia-ilustrada-do-mercado-de-cerveja-artesanal-nos-estados-unidos/#:~:text=Hoje%2C%20ela%20representa%20quase%2024,US%20%24%20100%20bilh%C3%B5es%20dos%20EUA..> Acesso em: 09 maio 2021.

GALLI, V. *et al.* Mild salt stress improves strawberry fruit quality. **LWT**, v. 73, p. 693 – 699, 2016.

GOUTON, M. *et al.* Validation of food visual attribute perception in virtual reality. **Food quality and preference**, v. 87, artigo 104016, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104016>. Acesso em: 28 maio 2022.

HANCK-SILVA, G. **Avaliação do potencial do ácido gálico encapsulado em *metal-organic frameworks* funcionalizados com cetuximabe no tratamento do cancer de próstata**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/215888>. Acesso em: 01 jun. 2022.

HOYLE, A. *et al.* Relationship between specific weight of spring barley and malt quality. **Journal of Cereal Science**, v. 95, p. 103006, 2020.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 1 ed. Digital. São Paulo: IMESP. 1020 p, 2008.

KIRIN. Kirin Beer University Report. Global beer consumption by country in 2019. (29 dez. 2020). Disponível em: https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2020/1229_01.pdf. Acesso em: 23 abr. 2021.

LAZO-VÉLEZ, M. A. *et al.* Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in food processing: a review. **Journal Applied Microbiology**, v. 125, n. 4, p. 943-951, 2018.

LEMONS, E. H. **Automação de um processo de malteação**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Automação Industrial) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Araxá, 2017.

LIMA, U. A. (org). **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 2. Ed. São Paulo: Blucher, v. 3, p. 760, 2019.

LOPES, A. C. *et al.* Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 6-10, 2015.

LOSER, A. L. **Avaliação do potencial de *Saccharomyces boulardii* na produção de cerveja probiótica**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário Católica de Santa Catarina, Joinville, 2017. Disponível em: http://app.catolicasc.org.br/imagens_biblio/000091/0000918C.pdf. Acesso em: 05 jun. 2022.

MAFRA, G. P. **Análise físico-química de cerveja american lager maturada com pimenta rosa (aroeira)**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

MENDONÇA, A. **Emprego de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* no processo de elaboração de cervejas com potencial probiótico**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2021.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONTENEGRO, K. P. B. **Viabilidade de produção de cerveja artesanal utilizando *Saccharomyces boulardii***. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V, BRESOLIN T. M. ; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, 27 (4): 688-693, 2007.

NASCIMENTO, B. J. **Desenvolvimento do protótipo: cervejaria artesanal móvel automatizada – CAMA**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

PAIXÃO, J. N. V. **Estudo de metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* para produção de glutatona utilizando melão de beterraba**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

PARK, *et al.* Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, 1999. Doi:10.1590/S0101-20611998000300011. Acesso em: 01 jun. 2022.

PHILPOTT, J.; TAYLOR, D. M.; WILLIAMS, D. R. Critical Assessment of Factors Affecting the Accuracy of the IoB Bitterness Method. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, n. 3, p. 103-106, 1997.

PIMENTA, L. B. *et al.* A história e o processo da produção da cerveja: uma revisão. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 26715, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/219992/1/26715-128097-1-PB.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2022.

PIRES, J. M. C. **Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio**. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de Évora, Évora, 2017.

PRESTES, D. N. **Desenvolvimento tecnológico de cervejas com matérias-primas de importância regional**. 2019. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

RAMOS, G. C. B.; PANDOLFI, M. A. C. A evolução do mercado de cervejas artesanais no Brasil. **Revista Interface Tecnológica**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 480-488, 2019.

REMIGIO, R. V. S. **Estudo cinético de três cepas de levedura em mosto cervejeiro**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

RIBEIRO, B. D. *et al* (org). **Microbiologia industrial: bioprocessos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 1, p. 680, 2018a.

RIBEIRO, B. D. *et al* (org). **Microbiologia industrial: alimentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 2, p. 477, 2018b.

RODRIGUES, M.A.; MORAIS, J.; CASTRO, J. P.(2015). O lúpulo: da cultura ao extrato. Técnica cultural tradicional. *In: Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio*, 2015, Bragança. **Atas [...]**. Bragança: Instituto Politécnico. p. 1-10.

ROSALIN, J. P. A trajetória da cerveja no Brasil: uma proposta de aproximação com a teoria da sucessão dos meios geográficos. **Geografia**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 149-165, jan. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/2447-1747.2021v30n1p149>. Acesso em: 01 jun. 2022.

SANNINO, C. *et al.* Non-conventional Yeasts for Producing Alternative Beers. *In: Sibirny A. (ed) Non-Conventional Yeasts: From Basic Research to Application*. **Springer Internacional Publishing**, p. 361–388, 2019.

SANTOS, D. A., ROCHA, A. M.; ANDRADE, V. D. Mapeamento Patentário sobre Recuperação de Leveduras Cervejeiras. **Revista Interdisciplinar De Pesquisa Em Engenharia**, v. 5, n. 2, p.27–40, 2019.

SANTOS, S. P. **Os primórdios da cerveja no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Ateliê Editorial, p. 51, 2003.

SEBRAE. **O mercado de cervejas artesanais no Brasil e em Santa Catarina – Cenários 2018 – 2020**. 2018. Disponível em: <https://atendimento.sebrae-sc.com.br/inteligencia/cenario/o-mercado-de-cervejas-artesanais-no-brasil-e-em-santa-catarina>. Acesso em: 24 abr. 2021.

SENKARCINOVA, B. *et al.* Probiotic alcoholfree beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldardii. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 362-367, 2019.

SLEIMAN, M. **Produção de cerveja com extrato de malte nas formas de xarope e pó: análise físico-química, sensorial e energética**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2002.

SILVA, A. F. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da bahia**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

SILVA, H. G.; SOUZA, P. G.; PINHEIRO, C. L. Estudo da reutilização de leveduras imobilizadas sobre a qualidade da cerveja cream ale. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 43083 – 43095, abr. 2021. Doi: [//doi.org/10.34117/bjdv7n4-665](https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-665). Acesso em: 01 jun. 2022.

SILVA, H. S.; LEITE, M. A; PAULA, A. R. V. Cerveja e sociedade. Contextos da Alimentação. **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, São Paulo, v.4, n. 2, p.85-91, 2016.

SILVA, P. H. A.; FARIA, C. F. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, dez. 2008. DOI: 10.1590/S0101-20612008000400021. Acesso em: 01 jun. 2022.

SILVA, R. N. P.; DIAS, J. F.; KOBLITZ, M. G. B. Beers: relationship between styles; phenolic compounds and antioxidant capacity. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 3, e. 42210313471, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i3.13471. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13471>. Acesso em: 1 jun. 2022.

SILVA FILHO, C. H. B. **Isolamento e identificação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de frutos de *Citrus × limonia* com capacidade de fermentação de mosto cervejeiro**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SINDICERV. Vendas de cerveja crescem 7,7% em 2021. **SINDICERV**, 2022. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/noticias/vendas-de-cerveja-crescem-77-em-2021/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

SINGH, R.; RATHORE, D. Oxidative stress defence responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) and chilli (*Capsicum annum* L.) cultivars grown under textile effluent fertilization. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.123, p. 342–358, 2018. Doi:10.1016/j.plaphy.2017.12.027. Acesso em: 01 jun. 2022.

SPIES, J. A. **Estudo sobre a isomerização de alfa-ácidos de lúpulo na produção de cerveja artesanal em diferentes condições de processo**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, 2018.

TOZZETO, L. M. **Produção e caracterização de cerveja artesanal adicionada de gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2017.

VIANA, A. C.; *et al.* American pale ale craft beer: influence of brewer's yeast strains on the Chemical composition and antioxidante capacity. **LWT**, v. 152, p. 112317, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112317>. Acesso em: 01 jun. 2022.

VIEIRA, A. C. G.; *et al.* Atividade antioxidante em cerveja comercial de trigo. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 7, n. 2, p. 239, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-239>. Acesso em: 01 jun. 2022.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Blucher, p. 576, 2016.

APÊNDICE A – Ficha utilizada para análise sensorial

TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DOS GOSTOS/ SENSações/ ODORES

Nome: _____ Telefone: _____

Etapa 1: Você está recebendo sete soluções identificadas com os gostos DOCE, SALGADO, AMARGO, ÁCIDO (ou azedo), UMAMI e sensações de METÁLICO e ADSTRINGENTE (sensação de "amarra" na boca). Prove-as cuidadosamente apenas com o objetivo de se familiarizar com os gostos e sensações.

Etapa 2: Você está recebendo sete soluções codificadas. Prove cuidadosamente cada solução e identifique o gosto ou a sensação percebida. Preencha, ao lado de cada código, o nome da sensação ou do gosto. Faça uma pausa e enxague a boca com água entre uma amostra e outra.

Amostra	Gosto ou Sensação
171	
567	
835	
565	
11	
876	
961	

Etapa 3: Você está recebendo 4 amostras codificadas. Prove cuidadosamente cada solução e ordene utilizando uma escala de 1 a 4, sendo 1 a amostra menos ácida e 4 a solução mais ácida. Faça uma pausa e enxague a boca com água entre uma amostra e outra.

Amostra	Ordenação
87	
118	
434	
26	

Etapa 4: Avalie as amostras na ordem apresentada. Identifique o odor e registre, quando tiver dúvida associe ou descreva o odor percebido. Não utilize termos como agradável/desagradável. Faça aspirações curtas e sequenciais, evite inalações profundas e longas. Aguarde alguns segundos para aspirar a próxima ou realize o branco aspirando o braço ou a mão.

Amostra	Identificação do odor
730	
42	
518	
203	
379	
115	

Comentários:

MUITO OBRIGADO (A)

APÊNDICE B – Atributos levantados pelo método de rede

		ATRIBUTO	DESCRIÇÃO
APARÊNCIA	1	Formação da Espuma	A uniformidade na formação da espuma, presença de renda no copo.
	2	Persistência da Espuma	Tempo para que diminua o colarinho na cerveja.
	3	Cor	A presença de coloração amarela. Que vai de amarelo palha até amarelo ambâr.
	4	Turbidez	Qualidade na passagem de luz pela amostra. Varia de cristalina a turva.
AROMA	5	Alcool	Odor característico do álcool
	6	Malte	Odor característico de malte
	7	Lúpulo	Odor característico de lúpulo
	8	Levedura	Odor característico de fermento, massa de pão
SABOR	9	Malte	Sabor característico de malte dominante
	10	Ácido	Sabor proveniente de ácido acético, vinagre
	11	Amargo	Sabor relacionado ao lúpulo
	12	Doce	Sabor adocicado
	13	Refrescância	Sensação de refrescância, cervejas frutadas, Witbier
	14	Residual de Cerveja	Residual presente na boca pós degustação
	15	Oxidado (Metálico)	Sabor característico/semelhante ao ferro
	16	Carbonatação	Percepção gasosa no paladar, relacionado ao CO2.
TEXTURA	17	Encorpado	Sensação de corpo ou da densidade percebida durante a degustação.

APÊNDICE C - Ficha de análise para Perfil Livre Flash

PERFIL FLASH

Nome: _____

Por favor, analise as cervejas apresentadas e preencha na tabela o código de cada amostra para os diferentes atributos. A amostra mais intensa deve ser ordenada em 5º lugar, a intermediária em 3º lugar e a menos intensa em 1º. Você poderá testar os produtos quantas vezes forem necessárias. Espere 30 segundos entre as amostras e limpe o palato com biscoito, não se esqueça de enxaguar a boca entre cada avaliação.

		ATRIBUTO	5º	4º	3º	2º	1º
APARÊNCIA	1	Formação da Espuma					
	2	Persistência da Espuma					
	3	Cor					
	4	Turbidez					
AROMIA	7	Lúpulo					
	8	Levedura					
SABOR	10	Ácido					
	11	Amargo					
	12	Doce					
	13	Refrescância					
	14	Residual de Cerveja					
	16	Carbonatação					
TEXTURA	17	Encorpado					

APÊNDICE D – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a) da pesquisa de “Fabricação de cerveja artesanal utilizando *Saccharomyces var. boulardii* como agente fermentador”, no caso de concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a Instituição. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço dos pesquisadores, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

Título da pesquisa: Fabricação de cerveja artesanal utilizando *Saccharomyces var. boulardii* como agente fermentador.

Pesquisadores responsáveis pela pesquisa:

Prof.^a Dr.^a Ellen Porto Pinto, (46) 99975-1477

Prof.^a Dr.^a Claudia Eugênia Castro Bravo, (46) 988095565

Bianca de Lima, (49) 99924-5933

Local de realização da pesquisa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Francisco Beltrão

Endereço: Linha Santa Bárbara, s/n, Francisco Beltrão - PR, 85601-970.

Telefone: (46) 3520-2600

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

Apresentação da pesquisa: Neste estudo vamos avaliar as características sensoriais de uma cerveja artesanal estilo Cream Ale produzida com uma levedura não convencional chamada *Saccharomyces cerevisiae var. Boulardii*, normalmente o fermento utilizado é *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos da pesquisa: Produzir cerveja artesanal puro malte estilo Summer Ale utilizando *S. cerevisiae var. boulardii* como agente fermentador. E caracterizar sensorialmente o produto.

Participação na pesquisa: Sua participação ocorrerá em duas etapas, com tempo aproximado de 30 a 60 minutos. Primeiramente será realizado o teste chamado de método de rede, onde você receberá 2 amostras de cerveja identificadas como A e B. Após provar ambas as cervejas, você deve preencher a ficha de levantamento de atributos elencando as diferenças e similaridades entre as amostras avaliando aparência, sabor e textura. Após levantamento dos atributos, um dos pesquisadores responsáveis preencherá a ficha com a descrição de cada atributo. Após estes procedimentos você receberá mais 5 amostras de cerveja para que as ordene na última ficha de avaliação, dependendo de como aquele atributo descreve a cerveja. O consumo total da bebida vai diferir de provador para provador, mas não ultrapassando o consumo total de 400 mL.

Confidencialidade: Os dados pessoais como nome e idade obrigatoriamente não serão divulgados. Para tratamento dos dados os julgadores receberam códigos para sua

identificação. Em casos de divulgação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não serão identificados os julgadores. As fotografias feitas durante a pesquisa ficarão sob responsabilidade dos pesquisadores, e em caso de divulgação em eventos científicos os participantes não serão identificados por nome.

Riscos e Benefícios.

Riscos: Os possíveis riscos provenientes da participação nesta pesquisa podem ser: constrangimentos ao preenchimento dos questionários caso o julgador não se sinta confortável em responder comunique algum dos pesquisadores. Desconforto em deglutir a bebida, um recipiente será entregue, juntamente com a bebida, para que escarre caso não sinta confortável em deglutir a bebida. Não é permitido a direção de veículos motorizados após o consumo. Pode trazer riscos a pessoas com doença celíaca e intolerantes ao glúten. A bebida passou por testes microbiológicos antes da análise sensorial para garantir sua qualidade microbiológica. Em caso de algum desconforto, ou mal estar, o participante será encaminhado ao serviço de atendimento médico mais próximo do local da realização da pesquisa pelos responsáveis do estudo.

Os protocolos de enfrentamento a pandemia do novo corona vírus serão rigorosamente seguidos, com limitação de pessoas, utilização da máscara durante toda a permanência exceto durante a degustação, disponibilização de álcool em gel na entrada e em cada cabine de análise e higienização da sala com álcool após cada grupo.

Benefícios: A pesquisa não fornecerá nenhum benefício direto ao participante. Para a comunidade, a fabricação de cerveja artesanal utilizando *S. cerevisiae* var. *boulardii* pode diminuir custos para a produção e tornar a cerveja um possível produto probiótico não lácteo.

Critérios de inclusão e exclusão.

Inclusão: Os participantes da pesquisa devem ser maiores de 18 anos por se tratar de uma bebida alcoólica e consumidores de cerveja artesanal.

Exclusão: Gestantes, participantes que possuem algum tipo de restrição alimentar relacionado ao consumo de cerveja.

Direito de sair da pesquisa e a esclarecimentos durante o processo.

O participante tem o direito de deixar a pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou penalização. O participante também pode questionar esclarecimentos em qualquer etapa da pesquisa. Se desejar, ao fim da pesquisa, o participante pode receber os resultados encontrados.

Você pode assinalar o campo a seguir, para receber o resultado desta pesquisa, caso seja de seu interesse:

() quero receber os resultados da pesquisa (email para envio : _____)

() não quero receber os resultados da pesquisa

Ressarcimento e indenização.

Nesta pesquisa não haverá nenhum custo ao participante, portanto não há nenhum tipo de ressarcimento. Em caso de algum tipo de dano ao participante o direito a indenização é obrigatório.

ESCLARECIMENTOS SOBRE O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:

O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEP) é constituído por uma equipe de profissionais com formação multidisciplinar que está trabalhando para assegurar o respeito aos seus direitos como participante de pesquisa. Ele tem por objetivo avaliar se a pesquisa foi planejada e se será executada de forma ética. Se você considerar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você foi informado ou que você está sendo prejudicado de alguma forma, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR). Endereço: Estrada para Boa Esperança, km 04, Zona Rural, Bloco G 10, Sala 675, 85660-000, Dois Vizinhos - PR Telefone: (46) 3536-8215, e-mail: coep-dv@utfpr.edu.br.

CONSENTIMENTO

Eu declaro ter conhecimento das informações contidas neste documento e ter recebido respostas claras às minhas questões a propósito da minha participação direta na pesquisa e, adicionalmente, declaro ter compreendido o objetivo, a natureza, os riscos, benefícios, ressarcimento e indenização relacionados a este estudo. Eu decidi, livre e voluntariamente, participar deste estudo, permitindo que os pesquisadores relacionados neste documento obtenham fotografia de minha pessoa para fins de pesquisa científica. As fotografias ficarão sob a propriedade do grupo de pesquisadores pertinentes ao estudo e sob sua guarda. Concordo que o material e as informações obtidas relacionadas a minha pessoa possam ser publicados em aulas, congressos, eventos científicos, palestras ou periódicos científicos. Porém, não devo ser identificado por nome ou qualquer outra forma. Estou consciente que posso deixar o projeto a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou penalização.

Nome Completo: _____

RG: _____ Data de Nascimento: ___ / ___ / _____ Telefone: _____

Endereço: _____

CEP: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Assinatura: _____ Data: ___ / ___ / _____

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível às questões formuladas.

Nome completo: Bianca de Lima

Data: ___ / ___ / _____

Assinatura pesquisador(a): _____

Para todas as questões relativas ao estudo ou para se retirar do mesmo, poderão se comunicar com Bianca de Lima, via e-mail: biadlima@outlook.com ou telefone: (49) 99924-5933.

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa que envolve seres humanos para denúncia, recurso ou reclamações do participante pesquisado:

Comitê de Ética em Pesquisa que envolve seres humanos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR)

Endereço: Estrada para Boa Esperança, km 04, Zona Rural, Bloco G 10, Sala 675, 85660-000, Dois Vizinhos - PR **Telefone:** (46) 3536-8215, **e-mail:** coep-dv@utfpr.edu.br.

ANEXO A - Porcentagem de álcool em volume a 20°C (% v/v) correspondente à densidade relativa.

D 20°C/20°C	% v/v						
1,00000	0,0	0,99632	2,5	0,99281	5,0	0,98956	7,5
0,99985	0,1	0,99618	2,6	0,99268	5,1	0,98944	7,6
0,99970	0,2	0,99603	2,7	0,99255	5,2	0,98931	7,7
0,99955	0,3	0,99589	2,8	0,99241	5,3	0,98919	7,8
0,99939	0,4	0,99574	2,9	0,99228	5,4	0,98906	7,9
0,99924	0,5	0,99560	3,0	0,99215	5,5	0,98893	8,0
0,99910	0,6	0,99546	3,1	0,99201	5,6	0,98881	8,1
0,99895	0,7	0,99531	3,2	0,99188	5,7	0,98869	8,2
0,99880	0,8	0,99517	3,3	0,99174	5,8	0,98857	8,3
0,99866	0,9	0,99503	3,4	0,99161	5,9	0,98845	8,4
0,99851	1,0	0,99489	3,5	0,99148	6,0	0,98833	8,5
0,99836	1,1	0,99475	3,6	0,99135	6,1	0,98820	8,6
0,99821	1,2	0,99461	3,7	0,99122	6,2	0,98807	8,7
0,99807	1,3	0,99447	3,8	0,99109	6,3	0,98794	8,8
0,99792	1,4	0,99433	3,9	0,99096	6,4	0,98782	8,9
0,99777	1,5	0,99419	4,0	0,99083	6,5	0,98770	9,0
0,99763	1,6	0,99405	4,1	0,99070	6,6	0,98758	9,1
0,99748	1,7	0,99391	4,2	0,99057	6,7	0,98746	9,2
0,99733	1,8	0,99377	4,3	0,99045	6,8	0,98734	9,3
0,99719	1,9	0,99363	4,4	0,99032	6,9	0,98722	9,4
0,99704	2,0	0,99349	4,5	0,99020	7,0	0,98710	9,5
0,99689	2,1	0,99336	4,6	0,99007	7,1	0,98698	9,6
0,99675	2,2	0,99322	4,7	0,98994	7,2	0,98686	9,7
0,99661	2,3	0,99308	4,8	0,98981	7,3	0,98674	9,8
0,99646	2,4	0,99295	4,9	0,98969	7,4	0,98662	9,9

Fonte: IAL (2008).

ANEXO B – Conversão da densidade relativa à 20°C/20°C em porcentagem de álcool em peso

Densidade Relativa	Álcool %						
1,00000	0,00	0,99777	1,20	0,99561	2,40	0,99354	3,60
0,99991	0,05	0,99768	1,25	0,99553	2,45	0,99346	3,65
0,99981	0,10	0,99759	1,30	0,99544	2,50	0,99337	3,70
0,99972	0,15	0,99750	1,35	0,99535	2,55	0,99329	3,75
0,99963	0,20	0,99741	1,40	0,99526	2,60	0,99320	3,80
0,99953	0,25	0,99732	1,45	0,99517	2,65	0,99312	3,85
0,99944	0,30	0,99723	1,50	0,99509	2,70	0,99303	3,90
0,99935	0,35	0,99714	1,55	0,99500	2,75	0,99295	3,95
0,99925	0,40	0,99705	1,60	0,99491	2,80	0,99286	4,00
0,99916	0,45	0,99695	1,65	0,99482	2,85	0,99278	4,05
0,99907	0,50	0,99686	1,70	0,99473	2,90	0,99270	4,10
0,99897	0,55	0,99676	1,75	0,99464	2,95	0,99262	4,15
0,99888	0,60	0,99668	1,80	0,99456	3,00	0,99253	4,20
0,99879	0,65	0,99659	1,85	0,99447	3,05	0,99245	4,25
0,99869	0,70	0,99650	1,90	0,99439	3,10	0,99237	4,30
0,99860	0,75	0,99641	1,95	0,99430	3,15	0,99229	4,35
0,99851	0,80	0,99632	2,00	0,99422	3,20	0,99221	4,40
0,99841	0,85	0,99623	2,05	0,99413	3,25	0,99212	4,45
0,99832	0,90	0,99614	2,10	0,99405	3,30	0,99204	4,50
0,99823	0,95	0,99606	2,15	0,99396	3,35	0,99196	4,55
0,99813	1,00	0,99597	2,20	0,99388	3,40	0,99188	4,60
0,99804	1,05	0,99588	2,25	0,99379	3,45	0,99179	4,65
0,99795	1,10	0,99579	2,30	0,99371	3,50	0,99171	4,70
0,99786	1,15	0,99570	2,35	0,99362	3,55	0,99163	4,75

Fonte: IAL (2008).

ANEXO C – Conversão da densidade relativa à 20°C/20°C em porcentagem de extrato

Densidade Relativa a 20°C/20°C	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20°C	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20°C/20°C	g Extrato em 100 g de solução
1,00000	0,00	1,00605	1,55	1,01213	3,10
1,00020	0,05	1,00624	1,60	1,01233	3,15
1,00039	0,10	1,00644	1,65	1,01253	3,20
1,00059	0,15	1,00663	1,70	1,01273	3,25
1,00078	0,20	1,00683	1,75	1,01292	3,30
1,00098	0,25	1,00702	1,80	1,01312	3,35
1,00117	0,30	1,00722	1,85	1,01332	3,40
1,00137	0,35	1,00742	1,90	1,01352	3,45
1,00156	0,40	1,00761	1,95	1,01371	3,50
1,00176	0,45	1,00781	2,00	1,01391	3,55
1,00195	0,50	1,00799	2,05	1,01411	3,60
1,00214	0,55	1,00820	2,10	1,01431	3,65
1,00234	0,60	1,00840	2,15	1,00451	3,70
1,00254	0,65	1,00859	2,20	1,01471	3,75
1,00273	0,70	1,00879	2,25	1,01490	3,80
1,00293	0,75	1,00897	2,30	1,01510	3,85
1,00312	0,80	1,00918	2,35	1,01530	3,90
1,00332	0,85	1,00938	2,40	1,01550	3,95
1,00351	0,90	1,00957	2,45	1,01570	4,00
1,00371	0,95	1,00977	2,50	1,01590	4,05
1,00390	1,00	1,00997	2,55	1,01609	4,10
1,00410	1,05	1,01016	2,60	1,01629	4,15
1,00429	1,10	1,01036	2,65	1,01649	4,20
1,00449	1,15	1,01056	2,70	1,01669	4,25
1,00468	1,20	1,01075	2,75	1,01689	4,30
1,00488	1,25	1,01095	2,80	1,01709	4,35
1,00507	1,30	1,01115	2,85	1,01729	4,40
1,00527	1,35	1,01134	2,90	1,01749	4,45
1,00546	1,40	1,01154	2,95	1,01769	4,50
1,00566	1,45	1,01174	3,00	1,01789	4,55
1,00585	1,50	1,01194	3,05	1,01808	4,60

Fonte: IAL (2008).

(continua)

(conclusão)

Densidade Relativa a 20°C/20°C	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20°C	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20°C/20°C	g Extrato em 100 g de solução
1,01828	4,65	1,02511	6,35	1,03201	8,05
1,01848	4,70	1,02531	6,40	1,03221	8,10
1,01868	4,75	1,02551	6,45	1,03242	8,15
1,01888	4,80	1,02571	6,50	1,03262	8,20
1,01908	4,85	1,02592	6,55	1,03263	8,25
1,01928	4,90	1,02612	6,60	1,03283	8,30
1,01948	4,95	1,02632	6,65	1,03324	8,35
1,01969	5,00	1,02652	6,70	1,03344	8,40
1,01988	5,05	1,02672	6,75	1,03365	8,45
1,02008	5,10	1,02693	6,80	1,03385	8,50
1,02028	5,15	1,02713	6,85	1,03406	8,55
1,02048	5,20	1,02733	6,90	1,03426	8,60
1,02068	5,25	1,02753	6,95	1,03447	8,65
1,02088	5,30	1,02774	7,00	1,03467	8,70
1,02108	5,35	1,02794	7,05	1,03488	8,75
1,02128	5,40	1,02814	7,10	1,03503	8,80
1,02148	5,45	1,02835	7,15	1,03529	8,85
1,02169	5,50	1,02855	7,20	1,03549	8,90
1,02189	5,55	1,02875	7,25	1,03570	8,95
1,02209	5,60	1,02896	7,30	1,03591	9,00
1,02229	5,65	1,02916	7,35	1,03611	9,05
1,02249	5,70	1,02936	7,40	1,03632	9,10
1,02269	5,75	1,02956	7,45	1,03652	9,15
1,02289	5,80	1,02977	7,50	1,03673	9,20
1,02309	5,85	1,02997	7,55	1,03693	9,25
1,02329	5,90	1,03018	7,60	1,03714	9,30
1,02349	5,95	1,03038	7,65	1,03735	9,35
1,02370	6,00	1,03058	7,70	1,03755	9,40
1,02390	6,05	1,03079	7,75	1,03776	9,45
1,02410	6,10	1,03099	7,80	1,03796	9,50
1,02430	6,15	1,03119	7,85	1,03817	9,55
1,02450	6,20	1,03140	7,90	1,03838	9,60
1,02470	6,25	1,03160	7,95	1,03858	9,65
1,02490	6,30	1,03181	8,00	1,03879	9,70

Fonte: IAL (2008).