

Thiago Jorge

**Caracterização da Farinha da Semente de Pinhão (*Araucária angustifolia*) e Aplicação como Adjunto na Produção de Cerveja**

Tese submetida ao Programa de  
Pós Graduação da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Doutor em  
Ciências dos Alimentos  
Orientador: Prof. Dr. Juliano De  
Dea Lindner  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvane  
Morés

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Jorge, Thiago  
Caracterização da Farinha da Semente de Pinhão  
(Araucária angustifolia) e Aplicação como Adjunto na  
Produção de Cerveja / Thiago Jorge ; orientador,  
Juliano De Dea Lindner, coorientadora, Silvane  
Morés, 2018.  
149 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Cerveja. 3.  
Adjuntos Cervejeiros. 4. Extrato Solúvel. 5. Pinhão  
(Araucária angustifolia). I. Dea Lindner, Juliano  
De. II. Morés, Silvane. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Thiago Jorge

**CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DA SEMENTE DE PINHÃO  
(*ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA*) E APLICAÇÃO COMO  
ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos

Florianópolis, 28 de Setembro de 2018.

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Ana Caroline de Oliveira Costa, Dr.<sup>a</sup>.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof. Luiz Gustavo Lacerda, Dr.  
Membro externo  
Universidade Estadual de Ponta Grossa (Videoconferência)

\_\_\_\_\_  
Prof. Eduardo Niehues, Dr.  
Membro externo  
Instituto Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof. Giustino Tribuzi, Dr.  
Membro interno  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado à minha  
família



## **AGRADECIMENTOS**

A Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina– FAPESC pelo apoio financeiro.

Agradeço o apoio financeiro pelas empresas que me apoiaram durante todo o percurso: Bio4 Soluções Biotecnológicas, LevTeck Tecnologia viva e BrewTime insumos cervejeiros.



Olho de Tigre meu amigo, olho de Tigre  
(Apollo, o Doutrinador, 1982)



## RESUMO

A cerveja, bebida industrializada produzida em sua grande proporção por adjuntos como o arroz e milho, vem se modernizando e acaba por modificar o gosto dos brasileiros. Essa modernização, atualmente tem como base fundamental, a lei da pureza alemã de 1516, na qual a composição da cerveja é essencialmente de cevada maltada, lúpulo, água e leveduras. Este uso de ingredientes mais nobres para a produção de cerveja gera produtos com maior qualidade, grande variedade de aromas e sabores. Partindo-se deste ponto, as microcervejarias e cervejarias artesanais tem explorado a cerveja puro malte. Além disso, a inserção de notáveis adjuntos como: café, mandioca, rapadura, castanha do pará, cascas de laranja, semente de coentro, pimenta e guaraná tem ganhado público e prêmios mundo afora. Com intuito de preservar, fortalecer e resgatar os costumes como parte do patrimônio cultural, a proposta deste trabalho está em utilizar o pinhão como parte integrante na elaboração de uma cerveja tipicamente regional. Semente do pinheiro (*Araucária angustifolia*) se estende na parte leste e central do planalto meridional do Brasil, compreendendo em sua maior parte os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Devido à importância econômica da espécie, foi gerado um intenso processo de exploração madeireira predatória, resultando atualmente em remanescentes fragmentados e empobrecidos que somam percentuais entre 21,9 a 26,9 %, da área original no Estado de Santa Catarina. O pinhão apresenta um valioso teor nutricional e energético, podendo ser considerado uma fonte de amido, fibra dietética, proteínas, vitaminas do complexo B, cálcio, fósforo, magnésio e cobre, constituindo assim um alimento de grande importância na segurança alimentar, principalmente das comunidades rurais da região serrana de Santa Catarina. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o amido da farinha de pinhão através de análise centesimal, microscopia eletrônica de varredura e uso da técnica de viscoamilografia. Além disso, as determinações físico-químicas e as correlações com potenciais redox na viabilidade da levedura cervejeira foram avaliadas. Foi ainda avaliada a análise por cromatografia gasosa com detecção de massas das formulações de cerveja produzida com zero, 20 e 50 g/100g em massa de pinhão em substituição ao malte.

Palavras chave: Cerveja, Adjuntos, Pinhão (*Araucaria angustifolia*), Extrato solúvel.

## ABSTRACT

Beer, an industrialized beverage produced in large proportion by adjuncts such as rice and corn, has been modernizing and ultimately changing the taste of Brazilians. This modernization now has as its fundamental basis the law of German purity of 1516, in which the composition of beer is essentially malted barley, hops, water and yeast. This use of noble ingredients for brewing produces products with higher quality, great variety of aromas and flavors. Starting from this point, microbreweries and craft breweries have explored the pure malt beer. In addition, the inclusion of notable adjuncts such as coffee, cassava, rapadura, brazil nut, orange peels, coriander seed, pepper and guarana has won public and prizes worldwide. In order to preserve, strengthen and recover customs as part of the cultural heritage, the purpose of this work is to use pinhão as an integral part in the elaboration of a typical regional beer. Seed of (*Araucária angustifolia*) extends in the eastern and central parts of the southern plateau of Brazil, comprising mostly the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. Due to the economic importance of the species, an intense predatory logging, currently resulting in fragmented and impoverished remnants that add up to between 21.9 and 26.9 % of the original area in the State of Santa Catarina. Pinhão presents a valuable nutritional and energetic content, being considered a source of starch, dietary fiber, proteins, vitamins of the complex B, calcium, phosphorus, magnesium and copper, constituting a food of great importance in food security, mainly of the communities areas of mountain region in Santa Catarina State. The objective of this work was to characterize the pinhão flour starch through centesimal analysis, scanning electron microscopy and viscoamilography technique. In addition, physico-chemical determinations and correlations with redox potentials and viability of brewer's yeast were evaluated. Gas chromatography analysis with mass detection of beer formulations produced with zero, 20 and 50 g/100g by mass of pinhão flour in substitution of malt was also evaluated.

Keywords: Beer, Adjuncts, Pinhão (*Araucaria angustifolia*), soluble extract.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia de valores do setor cervejeiro (CERVBRASIL, 2016). .....	27
Figura 2. Íons quimicamente ativos (KUNZE, 1999). .....	35
Figura 3. Demonstração gráfica da temperatura e pH com relação a atuação otimizada das enzimas (PALMER &HAMINSKI, 2013). .....	39
Figura 4. Classificação taxonômica do Lúpulo (PRIEST &STEWART, 2006). .....	40
Figura 5. Regiões favoráveis ao cultivo de lúpulo, compreendendo as latitudes 35 a 55° dos hemisférios norte e sul (em amarelo). Adaptado pelo autor ( <a href="http://www.google.com.br/mapamundi">www.google.com.br/mapamundi</a> ). .....	41
Figura 6. Desenho do cone de lúpulo à esquerda. 1) Cone integral do lúpulo; 2) Estrutura central; 3) Glândulas de lupulina; 4) Folhas; 5) Glândulas de lupulina (desenho ampliado). Corte transversal do cone do lúpulo à direita (WUNDERLICH &BACK, 2009; HIERONYMUS, 2012). .....	43
Figura 7. Fórmula molecular da estrutura de alfa ácido à iso alfa ácido e seus correspondentes grupos funcionais (R) (CABALLERO, BLANCO <i>ET AL.</i> , 2012). .....	44
Figura 8. Fórmula molecular das estruturas de beta ácidos e alfa ácidos e seus respectivos grupos funcionais (R) (PRIEST &STEWART, 2006). .....	45
Figura 9. Formação do composto (3-MBT) com exposição à luz (HAAS, 2013). .....	50
Figura 10. Formação de isohumulonas reduzidas. Ácido iso-alfa, Ácido Tetrahydro-iso-alfa, Ácido dihydro-iso-alfa e Ácido hexahidro-iso-alfa (CABALLERO, BLANCO <i>ET AL.</i> , 2012), (HAAS, 2013). .....	51
Figura 11. Representação das estruturas moleculares da amilopectina (com ligações do tipo: alfa 1-4 e 1-6) e da amilose (com ligações do tipo: alfa 1-4). .....	54
Figura 12. Corte longitudinal do grão de cevada: A-embrião; B- endosperma; C-camada aleurona; D-casca. Ampliação da estrutura celular do endosperma: E-parede celular (75 % de beta glucanos e 20 % de arabinosilano); F-proteínas; G-H- grande e pequenos grânulos de amido. Adaptado de (BAMFORTH, C. W., 2003). .....	58

Figura 13. Pinha (sementes da <i>Araucária angustifolia</i> ) contendo pinhões (SPADA, 2011).....	62
Figura 14. Perfil de uma viscoamilograma de amido (MUCCILLO, 2009).....	66
Figura 15. Eixo y (cP) e eixo x (tempo/min).Viscoamilogramas agregados dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho (SPADA, 2011).....	68
Figura 16. Consumo de carboidratos e enzimas ativas, pela <i>Saccharomyces ssp</i> (PRIEST & STEWART, 2006). ....	74
Figura 17. Via de fermentação alcoólica, adaptado pelo autor (VALLE, 2012). ....	76
Figura 18. Rampas de mosturação em função da temperatura com várias rampas de temperatura (BRIGGS, BOULTON <i>ET AL.</i> , 2004). ....	86
Figura 19. Rampas de mosturação em função da temperatura típico de dupla-decoção (BRIGGS, BOULTON <i>ET AL.</i> , 2004). ....	86
Figura 20. Rampas de mosturação em função da temperatura para adjuntos (.....) e para cevada maltada (___) (BRIGGS, BOULTON <i>ET AL.</i> , 2004). ....	87
Figura 21. Mashing: parâmetros a serem controlados, adaptado pelo autor (BRIGGS, BOULTON <i>ET AL.</i> , 2004). ....	88
Figura 22. Metabolismo de carboidratos com subprodutos intermediários ( $\alpha$ -acetolactato e diacetil) e produtos finais de fermentação (2,3 butanodiol e acetoína) (CARVALHO, 2009).....	91
Figura 23. i) Diagrama de Pourbaix da água a 25 °C (ii) e esquema genérico de um diagrama de Pourbaix adaptado por (O'KEEKE, 2001). ....	93
Figura 24. Programação de rampas de temperaturas, com infusão de malte de cevada, adaptado pelo autor (STEWART, 2013). ....	102
Figura 25. Curvas de RVA das farinhas de pinhão: 1- CRU sem casca interna; 2- Germinado; 3- CRU com casca interna; 4- CONG sem casca interna; 5- CONG com casca interna e 6- pré-gelatinizado GEL.....	110
Figura 26. Viscoamilogramas das farinhas. 1 e 2 - Farinha de pinhão in natura congelada; 3 e 4- Farinha de pinhão in natura congelada (99 g/100g) + cevada maltada (1 g/100g).....	112

Figura 27. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das farinhas de pinhão. A- Pinhão in natura (CRU); B- Pinhão congelado; C- Pinhão pre-gelatinizado. ....	114
Figura 28. Método de mosto congresso para diferentes g/100g das farinhas de cevada maltada e pinhão pré-gelatinizado, com as determinações de cor, extrato solúvel (g/100g, °P), pH e teste de iodo. Amostras 1: 100 g/100g (cevada maltada); 2: 90-10 g/100g; 3: 80-20 g/100g; 4: 70-30 g/100g; 5: 60-40 g/100g; 6: 55-45 g/100g; 7: 50-50 g/100g; 8: 40-60 g/100g; 9: 30-70 g/100g; 10: 20-80 g/100g; 11: 10-90 g/100g; 12: 100 g/100g (pinhão pré-gelatinizado) com enzimas. ....	115
Figura 29. Média dos rendimentos das amostras (quadrado preto), e média dos rendimentos em base seca (quadrado cinza), das proporções entre cevada maltada e pinhão (GEL), técnica EBC (4.5.1). Amostras 1: 100 g/100g CM (cevada maltada); 2: 90-10 g/100g; 3: 80-20 g/100g; 4: 70-30 g/100g; 5: 60-40 g/100g; 6: 55-45 g/100g; 7: 50-50 g/100g; 8: 40-60 g/100g; 9: 30-70 g/100g; 10: 20-80 g/100g; 11: 10-90 g/100g; 12: 100 g/100g PPF (pinhão pré-gelatinizado) com enzimas. ....	119
Figura 30. a- representação gráfica da multiplicação celular das leveduras (UFC/mL) perante as diferentes composições de cevada maltada e farinha de pinhão (0, 20 e 50 g/100g). b- representação gráfica do decaimento da densidade específica (g/mL) obtida a partir das diferentes composições de cevada maltada e farinha de pinhão ( 0,20 e 50 g/100g). Cor azul: 0 g/100g; Cor vermelha 20 g/100g; Cor verde 50 g/100g. ....	122
Figura 31. Representação gráfica da atenuação aparente (%), para as diferentes composições de mosto cervejeiro, utilizando farinha pre-gelatinizada de pinhão. (Valores de referência: 65-70 % Baixa; 71-75 % Média; 76-85 % Alta). EBC 4.11.1. ....	124
Figura 32. Representação gráfica do crescimento celular (linha contínua azul) e potencial redox, Eh ( linha pontilhada vermelho), das diferentes composições de mosto, em fase anaeróbica fermentativa. ....	126
Figura 33. a-b-c. Representação gráfica da densidade específica (linha azul) e potencial redox, Eh (mV) (linha vermelha). Das diferentes composições de mosto, em fase anaeróbica fermentativa. ....	126

Figura 34. Representação gráfica da tendência (linha preta) do comportamento redox, Eh (mV), perante as diferentes composições de mosto cervejeiro. Linha azul (0g /100g pinhão), linha vermelha (20g /100g pinhão) e linha verde ( 50g /100g Pinhão). .....	128
Figura 35. a-b-c. Representação gráfica do pH (linha azul) e potencial redox, Eh (mV) (linha vermelha). Das diferentes composições de mosto, em fase anaeróbica fermentativa. ....	129
Figura 36. Diagrama de Pourbaix da cerveja à 25 °C. Divididos em 04 campos, sendo estes: O.A: oxidante ácido, O.B: oxidante básico, R.A: redutor ácido e R.B: redutor básico. A: 100 g/100g cevada maltada (linhas tracejadas com círculos); B: 80 g/100g cevada maltada (linha sólida com quadrados); C: 50 g/100g cevada maltada (linha pontilhada com triângulos). ....	130
Figura 37. Perfil cromatográfico em CG-MS dos compostos voláteis na água de pinhão (1) e nas cervejas produzidas com mosto 100 g/100g cevada maltada (2), 80 g/100g cevada maltada (3) 50 g/100g cevada maltada (4). A: dióxido de carbono; B: álcool etílico; C: etil acetato; D: 3-metil-1-butanol; E: 2-metil-1-butanol; F: ácido hexanóico; G: fenil etil ester; H: ácido octanóico; I: 2-fenil-etil-ester; J: etil-9-decenoato; K: ácido decanóico; L: isopentil ester; M: ácido dodecanóico; O: nonanal; P: undecanal; Q: heneicosane; R: tetradecanal; S: 1-propil-octil benzeno; T: 1-butil-octil benzeno; U: 1-propil-nonil benzeno; V: etil decil benzeno; W: butil nonil benzeno.....	132

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Correlações entre duas espécies de cevada.....	52
Quadro 2. Relações benéficas de escolha da cevada. ....	53
Quadro 3. Análises típicas do malte verde. ....	59
Quadro 4. Ordem de assimilação dos aminoácidos pela levedura.....	74
Quadro 5. Importância dos microrganismos contaminantes de acordo com seus potenciais de deterioração da cerveja. ....	83
Quadro 6. Correlação dos números de amostras coletadas com o tempo em horas .....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de sais da água de diferentes regiões.....	34
Tabela 2. Grau hidrotimétrico de diferentes países.....	37
Tabela 3. Teores de dureza da água.....	37
Tabela 4. Produto de solubilidade dos sais a 25 °C.....	37
Tabela 5. Composição química do lúpulo in natura.....	41
Tabela 6. Composição do grão de cevada e do malte.....	55
Tabela 7. Composição (%) de pinhão por 100 gramas de parte comestível (Pinhão Cozido), algumas referências importantes.....	63
Tabela 8. Temperaturas de gelatinização dos adjuntos mais utilizados na produção cervejeira (Annemuller e Manger, 2013).....	65
Tabela 9. Propriedade de pasta dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho.....	69
Tabela 10. Temperatura e pH ótimos com suas respectivas enzimas atuantes.....	88
Tabela 11. Atividade enzimática que ocorre durante a brassagem, temperaturas e pH ótimos para a ativação de enzimas responsáveis pela hidrólise dos carboidratos presentes no malte.....	103
Tabela 12. Concentração típica dos açúcares no processo de mostura (obtenção do mosto).....	104
Tabela 13. Análise centesimal das farinhas de pinhão.....	107
Tabela 14. Propriedades Físico-química de alguns adjuntos em base seca.....	108
Tabela 15. RVA dos resultados das amostras das farinhas de pinhão.....	110
Tabela 16. Comparação entre os perfis dos viscoamilogramas das farinhas de pinhão in natura congelada e farinhas de pinhão in natura congelada com adição de cevada maltada, determinado neste trabalho.....	112
Tabela 17. MeV para diferentes adjuntos utilizados em cervejarias.....	117
Tabela 18. Comparação entre as farinhas puras, utilizando a metodologia de mosto congresso, entre Cevada maltada e pinhão pre-gelatinizado.....	117
Tabela 19. Classificação das cervejas produzidas neste trabalho.....	120
Tabela 20. Quantidade de amido total restante no resíduo de malte, das seguintes proporções entre farinha de cevada maltada e pinhão pre gelatinizado: (100-0 g/100g), (80-20 g/100g) e (50-50 g/100g).....	121

## **LISTA DE ESQUEMAS**

Esquema 1. Resumo do processo de malteação (Priest e Stewart, 2006), adaptado pelo autor.....	56
Esquema 2. Determinação do extrato solúvel (também conhecido como mosto congresso), utilizado neste trabalho, conforme metodologia (E.B.C, 2004a), adaptado pelo autor.....	99

## Glossário

***Beautiful Beer*** – Movimento surgido na Inglaterra com o objetivo de disseminar e valorizar a cultura cervejeira, principalmente por meio do reposicionamento do produto a partir da antiga imagem de bebida popular e de pouca sofisticação para uma nova e moderna personalidade.

***BJCP*** ([www.bjcp.org](http://www.bjcp.org)) – Uma das classificações mais aceitas mundialmente é o Guia de Estilos do Beer Judge Certification Program (BJCP), elaborado por uma associação sem fins lucrativos, fundado no Colorado (EUA), em 1985, durante a American Homebrews Association Annual Conference, que nasceu da necessidade de uniformizar critérios de identificação e julgamento de estilos de cerveja e formar críticos e avaliadores de cerveja. O BJCP é adotado nos concursos cervejeiros Americanos e de muitos outros países, inclusive no Brasil, no festival nacional da cerveja, na cidade de Blumenau-SC.

***Camra*** – Abreviação de *Campaign for the Real Ale*, movimento iniciado na Inglaterra em 1971 para resgatar e promover a tradição das antigas cervejas Ale inglesas *cask-conditioned*.

***Homebrew*** – Produção de cerveja em instalações caseiras, em pequenas quantidades e de forma artesanal.

**Lei de Pureza** – Lei estabelecida em 1516, pelos duques Wilhelm IV e Ludwig X, para regular a produção de cerveja à época. A partir de então, só foi permitida a fabricação de cervejas que utilizassem malte de cevada, água e lúpulo (fermento e fermentação eram desconhecidos). Em 1906, a Lei foi modificada para acrescentar o fermento e admitir o trigo como adjunto. Foi revogada em 1987, depois de muita pressão internacional, mas continua sendo uma exigência do consumidor alemão e uma boa referência de qualidade em todo o mundo. Em alemão *Reinheitsgebot*.

**Premiumrização** – Processo de diferenciação do produto. O mercado tem demonstrado um movimento natural de premiumrização, mas o processo deve ser feito com cuidado porque existem riscos, como banalização e uso indevido do termo. Quando todas as marcas apresentam linhas *premium*, o consumidor pode ter a percepção de que todas são iguais, o que representará uma perda para o mercado em geral. Por outro lado, a alta competição dentro do segmento também faz com

que as empresas busquem aprimorar ainda mais o que é oferecido. Isso é benéfico para o cliente, que leva pra casa algo ainda melhor.

Cerveja tipo Ales – Cerveja de alta fermentação, na qual as leveduras no início do processo fermentativo tendem a ficar no topo do fermentador.

A temperatura de fermentação ocorre em torno de 18 a 25 °C.

Cerveja tipo Lager – Cerveja de baixa fermentação, na qual as leveduras no início do processo fermentativo estão no fundo do fermentador. A temperatura de fermentação ocorre em torno de 9 a 15 °C.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1.	Justificativa do Estudo.....	31
2.2.	Matérias Primas para elaboração de Cerveja.....	32
2.2.1.	Água.....	32
2.2.2.	Lúpulo.....	39
2.2.3.	Cevada.....	51
2.2.4.	Adjuntos Cervejeiros.....	60
2.2.4.1.	<i>Araucária angustifolia</i> .....	62
2.2.5.	Leveduras.....	70
2.3.	Contaminantes da Cerveja.....	79
2.4.	Processo de Fabricação da Cerveja.....	84
2.4.1.	Produção do mosto cervejeiro.....	85
2.4.2.	Fermentação e Maturação.....	90
2.4.3.	Potenciais eletroquímicos (redox) e aromas.....	93
3.	OBJETIVO GERAL.....	94
3.1.	Objetivos Específicos.....	94
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	95
4.1.	Extração e análises da farinha de pinhão.....	95
4.1.1.	Local de execução.....	95
4.1.2.	Matérias primas.....	96
4.1.3.	Obtenção da farinha crua de pinhão <i>in natura</i> (CRU)..	96
4.1.4.	Obtenção da farinha de pinhão cru e congelado (CONG).....	97

4.1.5.	Obtenção da farinha de pinhão pré-gelatinizado (GEL).....	97
4.1.6.	Análise centesimal das farinhas de pinhão.....	97
4.1.7.	Análise de viscosidade das farinhas de pinhão.....	98
4.1.8.	Metodologia utilizada para determinação do extrato solúvel (mosto congresso).....	99
4.1.9.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	100
4.1.10.	Análise Estatística.....	100
4.2.	Metodologia de confecção do mosto e fermentação alcoólica.....	100
4.2.1.	Local e equipamentos.....	100
4.2.2.	Preparo do mosto cervejeiro.....	101
4.2.3.	Composição típica de um mosto cervejeiro.....	103
4.2.4.	Fermentação alcoólica.....	104
4.2.5.	Determinações – Fase Fermentativa.....	104
4.2.6.	Procedimento das Leituras.....	105
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	106
5.1	Composição centesimal das farinhas de pinhão.....	106
5.2	Viscoamilogramas das farinhas de pinhão.....	109
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	113
5.4	Mosto Congresso.....	115
5.5	Quantidade de Malte Equivalente (MeV).....	116
5.6	Rendimento da farinha de pinhão pre-gelatinizado.....	118
6.	FERMENTAÇÃO.....	121
6.1	Perfil físico-químico.....	121

6.2	Perfil eletroquímico (redox) e aromáticos.....	125
7.	CONCLUSÃO.....	133
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136





## 1. INTRODUÇÃO

Com a globalização de mercado e as fusões de cervejarias, a indústria se consolidou num grande mercado por todo o mundo. No Brasil, em 1999, a fusão das Cervejarias Centenárias Brahma e Companhia Antártica fez surgir a Ambev – Companhia de bebidas das Américas (AMBEV, 2014). A criação da Ambev e sua posterior fusão com a gigante belga Interbrew, resultou na InBev. Em 2008, a cervejaria InBev concluiu a compra da cervejaria americana Anheuser-Busch, fabricante da Budweiser, criando assim o maior grupo cervejeiro do mundo, AB-InBev. Estes foram os fatos mais marcantes da história da cerveja brasileira e mundial das últimas décadas (CARVALHO, 2009).

O Brasil ocupa atualmente a 3ª posição mundial em produção de cerveja, com uma produção de cerca de 14 bilhões de litros/ano (CERVBRASIL, 2016), atrás apenas da China (45 bilhões) e Estados Unidos (35 bilhões), superando a Rússia (11,6 bilhões) e a Alemanha (10,8 bilhões). O segmento cervejeiro responde por mais de 70 % do mercado de bebidas alcoólicas, com faturamento anual de cerca de R\$ 77 bilhões em 2016 (CERVBRASIL, 2016).

Com cerca de 2,2 milhões de pessoas empregadas ao longo de sua cadeia, o segmento é um dos maiores empregadores do Brasil. Somente em 2016, o setor da cerveja gerou R\$ 23 bilhões em impostos. Como possui um efeito multiplicador na economia, sua atuação movimenta uma extensa cadeia produtiva que é responsável por 1,6 % do PIB e 14 % da indústria de transformação nacional, Figura 1 (CERVBRASIL, 2016).



Figura 1. Cadeia de valores do setor cervejeiro (CERVBRASIL, 2016).

A cerveja no Brasil criou a cultura de consumo do tipo Pilsen. Sob o domínio de algumas poucas marcas e com a mesma equivalência entre seus rótulos, a cerveja no Brasil, sempre teve um tratamento mais

de refresco do que de bebida alcoólica, sendo tradicionalmente abordada como uma bebida gelada pouco sofisticada (RONALDO, 2009). O brasileiro foi acostumado a beber só esse tipo de cerveja e também aprendemos que cerveja é para ser bebida gelada e em ambientes festivos. Por um período esses argumentos de vendas surtiram efeitos, os consumidores optavam pelos produtos e as empresas fabricantes reduziam os custos oferecendo um portfólio pequeno. O ganho se dava em volume. Isso continua acontecendo, mas as opções aumentaram, seja pela grande oferta de rótulos oferecida pelas microcervejarias, ou mesmo pela pouca oferta oferecida pelas grandes empresas (PARRA, 2015a). Por outro lado, este avanço das fusões de megacervejarias propiciou uma boa chance de investimento no segmento de microcervejarias, possibilitando assim ao consumidor ter novas experiências na degustação de cervejas especiais, que a maioria das grandes cervejarias normalmente não pode oferecer (REINOLD, 2011a). Esse movimento pelo gosto de novos sabores começou a ser consolidada dentro e fora do setor cervejeiro, e nas últimas décadas com uma onda, surgiu o renascimento da cerveja. O movimento começou na Inglaterra em 1972, com a preocupação da crescente massificação e industrialização da cerveja, como o *beautiful beer* e o CAMRA (*Campaign for Real Ale*), e nos Estados Unidos se iniciou em 1979, quando o então Presidente Jimmy Carter, revogou as restrições à produção de cerveja caseira. Esta foi uma das principais razões da popularidade do movimento de fabricar cerveja em casa (*homebrewing*) que tomou conta do Canadá e EUA e chegou finalmente ao Brasil. A filosofia destes movimentos que tem por base o resgate da história, da cultura e do prazer de se fazer e consumir boas cervejas, associadas à gastronomia de qualidade, acabou por atingir o Brasil no final dos anos de 1980 (RONALDO, 2009).

Nesse contexto, surgiram as cervejarias artesanais e os cervejeiros caseiros (*homebrew*) que têm como atração a produção da própria cerveja, ao contrário da maioria das cervejas produzidas pelas grandes cervejarias e disponíveis para o consumidor comum da grande distribuição (FERREIRA, VASCONCELOS *ET AL.*, 2011). No Brasil, observa-se uma iniciativa em consolidar esse movimento, exemplo disso é a criação das Acervas, conhecidas como Associações de Cervejeiros Artesanais, que são entidades criadas com intuito de fomentar o desenvolvimento e a cultura cervejeira. Essas associações têm por base contribuir para o avanço e a consolidação do movimento recém chegado ao Brasil e que mudou a história da cerveja ao redor do mundo, chamado de *The Craft Beer Renaissance*: O renascimento da Cerveja

Artesanal (BIANCOLILLO, BUCCI *ET AL.*, 2014), e como o nome sugere, trata-se de um resgate das milenares tradições de produção.

Atualmente no Brasil, para defender os interesses do setor e representar as indústrias perante o mercado nacional, foi criada em outubro de 2013 a Associação Brasileira de Microcervejarias e Empresas do Setor Cervejeiro (Abracerva). Estima-se que existam cerca de 675 microcervejarias em atividade no país, principalmente concentradas nas regiões Sul e Sudeste (MAPA, 2017; ABRACERVA, 2018). Enquanto o mercado de *mainstream* ficou com um crescimento de 1 %/ano, as cervejas especiais cresceram entre 10 e 15% em 2015. As vendas das microcervejarias representam algo próximo de 0,5 % do mercado de 13,5 bilhões, algo próximo de cerca de 70 milhões de litros. Ainda é pequeno, mas segundo um estudo da Mintel Group o negócio de cervejas diferenciadas cresceu 36 % de 2010 a 2013, o que demonstra que o mercado brasileiro passa por um processo de “premiumização” da bebida (PARRA, 2015a). Esses valores refletem o surgimento de novas microcervejarias, que chegam a uma crescente no país, em um mercado dominado por quatro grandes empresas: AB-InBev com 67,12 % do mercado; Brasil-Kirin que recentemente adquiriu a Heineken ficando com 18,79 % e a Cervejaria Petrópolis com 12,4 %, a única com exclusivo capital nacional (REINOLD, 2013).

As cervejas artesanais apresentam diferenciação no processo e emprego de matérias primas se comparadas às cervejas comercializadas e populares. Esse termo, no Brasil, refere-se às cervejas tanto importadas quanto as produzidas de “forma caseira”, ou até mesmo nas microcervejarias, que utilizam matérias primas de alta qualidade, com pouco ou nenhum aditivo, além de equipamentos de menor capacidade. Porém, possuem uma maior atenção em sua produção, elaborando cervejas diferenciadas, que contenham formulações tradicionais e antigas, originando resultados bem interessantes e próprios (REINOLD, 2011b).

Algumas dessas cervejas especiais seguem a Lei de Pureza Alemã (*Reinheitsgebot*) de 1516, que é o mais antigo código de alimentos do mundo em vigor, decretado pelo Duque Guilherme IV. A Lei de Pureza determina que apenas água, cevada maltada, lúpulo e fermento cervejeiro são os ingredientes utilizados na elaboração da cerveja e proíbe o uso de conservantes ou cereais não maltados (adjuntos). Em outras microcervejarias, além do malte, água, lúpulo e fermento, as cervejas especiais levam em suas formulações iguarias das mais diversas regiões e também podem ser mais exóticas contando com a criatividade de cervejeiros e especialistas no assunto (PARRA, 2015a).

A valorização das cervejas *premium* no mercado brasileiro está se dando não apenas pela estabilização da economia, que significa aumento do poder aquisitivo da população, mas também pela variedade oferecida, em conjunto com ações voltadas a gastronomia, como o aumento dos cursos para formação de tecnólogos cervejeiros, *beer sommeliers*, que entre outras atividades, trabalham como intermediários entre cervejarias e consumidores (REINOLD, 2013),(PARRA, 2015b). Um dos fatores que está por trás desse aumento exponencial de novas microempresas é a relativa facilidade com que o mercado acessa as tecnologias de produção. Hoje, com máquinas 100 % nacionais, é muito mais barato iniciar uma pequena fábrica de cerveja (JAKITAS, 2015).

Microcervejarias é um termo que surgiu recentemente para designar empreendimentos que visam produzir cerveja com diferencial local, atendendo a argumentos de tradição e/ou qualidade diferenciada, não se preocupando com a questão da produção industrial (FERREIRA, VASCONCELOS *ET AL.*, 2011). Como no Brasil não existe nenhuma legislação a respeito da classificação do porte das cervejarias, para melhor entendimento, podemos classificá-las em: *i) Cervejeiro caseiro* – produz cerveja apenas para consumo próprio, pois é vedado qualquer tipo de comercialização. Os volumes oscilam entre 20 e 50 litros; *ii) Nanocervejaria* – pequena cervejaria com capacidade de produção entre 50 e 200 litros por cozimento (500 litros nos Estados Unidos); *iii) Microcervejaria* – pequena cervejaria com capacidade de produção entre 200 e 6.000 litros; *iv) Cervejaria de pequeno porte* – cervejaria com capacidade de produção entre 6.000 a 20.000 litros; *v) Cervejaria de médio porte* – cervejaria com capacidade de produção entre 20.000 a 50.000 litros; *vi) Cervejaria de grande porte* – cervejaria com capacidade de produção acima de 50.000 litros (REINOLD, 2011a).

O presente trabalho teve como propósito a criação de uma cerveja utilizando a farinha de pinhão como adjunto cervejeiro, dando assim uma característica regional brasileira. O uso da farinha de pinhão (*Araucaria angustifolia*), conhecida como Pinheiro do Paraná, Pinheiro ou Araucária, proporciona uma rica fonte de carboidratos contribuindo como fonte de extrato solúvel e em segundo plano, fomentar a cultura e a cadeia produtiva que envolve o cultivo do pinhão, conscientizando as pessoas ao não desmatamento da espécie nativa da mata Atlântica com atuais 2 % remanescentes da mata original (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007; CONAB, 2014).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Justificativa do Estudo

O consumo da semente do pinhão faz parte da cultura da população, principalmente da região sul do Brasil, dentre as festividades dedicadas ao pinhão vale destacar a tradicional festa do pinhão de Lages-SC e a feira do pinhão em Curitiba-PR. Apesar da importância histórico-cultural na alimentação da população dessas regiões, pouca atenção tem sido dada a pesquisas sobre vários aspectos que envolvem seu consumo (SANTOS, CORSO *ET AL.*, 2002). Em pouco mais de 100 anos, a exploração intensa e desordenada da árvore da araucária quase levou ao desaparecimento dessa espécie, sendo este um dos principais motivos para a inclusão do pinhão na política de garantia de preços mínimos, com vistas à preservação da espécie, bem como à garantia de renda para as famílias que trabalham com o extrativismo do pinhão. A *A. angustifolia*, é uma árvore de destacada importância cultural, econômica e ambiental no Brasil, sendo que o termo pinhão geralmente designa as sementes da espécie (CONAB, 2014).

Devido à importância econômica da espécie foi gerado um intenso processo de exploração madeireira predatória, para indústrias de móveis, construção de casas e produção de celulose (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007), compostos resiníferos e alimentar (EIRA, SALOMÃO *ET AL.*, 1994), resultando atualmente em remanescentes fragmentados e empobrecidos que somam percentuais entre 21,9 a 26,9 %, da área original no Estado de Santa Catarina e apenas 2 % da área total original, perfazendo aproximadamente 200 mil km<sup>2</sup> (CONAB, 2014). A compreensão acerca do funcionamento desta cadeia extrativista faz-se necessário para que políticas para a produção da semente, intimamente ligada a conservação da espécie *A. angustifolia*, possa ser melhor direcionada (SANTOS, CORSO *ET AL.*, 2002).

Desde 1986, a *A. angustifolia* está incluída na “lista de espécies que necessitam de atenção” elaborada pela Food and Agriculture Organization (EIRA, SALOMÃO *ET AL.*, 1994) apud (FAO, 1986). Nos dias atuais, a *A. angustifolia* ainda encontra-se na “lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção”, como espécie vulnerável (BRASIL, 2008), e também pela IUCN (União Internacional para conservação da Natureza), do Estado e do País (ZECHINI, 2012). Os pinhões contêm pouca proteína entre os grânulos de amido, isso favorece a extração do amido como fonte de glicose e frutose. O simples método de extração e o alto rendimento do amido do pinhão podem ser

através não somente para experimentos em planta piloto, como também para produção em escala comercial (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006).

A comercialização visa minimizar o desperdício e desenvolver as agroindústrias regionais, agregando valor ao produto e colaborando diretamente para o crescimento econômico da região. Com intuito de preservar e resgatar os costumes como parte do patrimônio cultural, a justificativa deste trabalho, está em utilizar a semente de pinhão (como farinha) como parte integrante na elaboração de uma cerveja tipicamente regional.

## 2.2. Matérias Primas para elaboração de Cerveja

### 2.2.1. Água

A água de uso na cervejaria ou água cervejeira deve ser padronizada para cada tipo de formulação seguindo condutas de potabilidade, incluindo os físico-químicos e microbiológicos, além das análises das substâncias químicas (agrotóxicos) e sensoriais, tendo por base os critérios especificados pelo MS Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011). Conforme as necessidades e objetivos da cervejaria, a água potável empregada na elaboração da cerveja poderá ser tratada com substâncias químicas, por processos físicos ou outro que lhe se assegure as características desejadas para boa qualidade do produto (BRASIL, 2009b). A água é o constituinte majoritário da cerveja, compondo de 90-95 % da composição do produto. A água e seus sais têm grande importância, tanto para a produção de cerveja (brassagem e fervura), quanto para a cerveja pronta na contribuição do *flavour* (BAMFORTH, C. W., 2003; BUIATTI, 2009).

A quantidade de sais dissolvidos e dos compostos orgânicos presentes na água influenciam diretamente os processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fabricação da cerveja e consequentemente o resultado final (VENTURINI, 2010). A composição da água é fortemente influenciada pelas condições da geologia do solo e suas diferentes regiões de captações, podendo conter diversas substâncias responsáveis, por exemplo, pela dureza da água (ESSLINGER & NARZISS, 2005). Os íons da água reagem com ingredientes do malte e, portanto, podem afetar o pH do mosto e brassagem. Alguns minerais contidos na água são importantes como o magnésio e o zinco, pois aceleram e regulam o processo fermentativo.

Cada estilo de cerveja nasceu e tem sua identidade a partir da composição mineral de sua água.

Os sais são os grandes responsáveis por essa diversidade e característica de uma cerveja local (KUNZE, 1999; BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; PRIEST & STEWART, 2006).

Da cidade de Pilzen ou Pilsen (República Checa), que originou a cerveja de mesmo nome, tem característica de dureza e alcalinidade baixas e não interferem de modo importante no pH da mostura. A água da cidade de Munich (Alemanha) é alcalina, possuindo uma alta concentração de sais de cálcio e bicarbonato, que após abrandamento da água, através de pré-fervura, dão aos estilos *munich helles* e a *amber oktoberfest* às características peculiares. Já para as águas de cervejas do tipo Lager, dos estilos export lager e vienna lager das cidades de Dortmund (Alemanha) e Vienna (Áustria), os sabores maltados e o amargor do lúpulo presentes são acentuados pela alta concentração de sais de cálcio, magnésio e sulfatos (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; RONALDO, 2009). Águas de diferentes localidades do Reino Unido (cidades Inglesas, Irlandesas e Escocesas), possuem águas mais “duras” (altos teores de cálcio e magnésio) em relação às Alemãs. Da cidade Burton (Inglaterra), originou-se o estilo India Pale Ale, sendo uma água extremamente dura, rica em sulfato de cálcio e bicarbonatos, proporcionado ao estilo amargor acentuado pelos sais de sulfato. A água de Dublin (Irlanda) é semelhante à água de Londres (Inglaterra), por proporcionar um alto teor de sais de cálcio e bicarbonato, sendo águas mais adequadas para os estilos de cervejas Dry Stouts, Dunkel e Porters (PALMER & HAMINSKI, 2013).

A cidade Escocesa de Edimburgo possui uma água local com caráter defumado (turfas), com médio teores de cálcio, sulfatos e bicarbonatos, tendo como estilo de cerveja as Strong Scottish Ales, de coloração rubi (AQUARONE, BORZANI *ET AL.*, 2001). Conhecendo as composições de sais de diferentes localidades de cidades cervejeiras do mundo, Tabela 1, é possível reproduzir qualquer estilo de cerveja (LEA & PIGGOTT, 2003).

Tabela 1. Teores de sais da água de diferentes regiões.

Cidade/Estilo (ppm)	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>	(HCO <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>
Pilsen/Pilsen	10	3	3	4	3	4
Dublin/Dry Stout	118	4	12	54	319	19
Munich/Oktobertfest	76	18	2	10	152	2
Vienna/Vienna Lager	200	60	8	125	120	12
Dortmund/Export Lager	225	40	60	120	180	60
London/British Bitter	52	32	86	32	104	34
Edinburgh/Scottish Ale	125	25	55	140	225	65
Burton/India Pale Ale	352	24	54	820	320	16

**Fonte:** (PALMER & HAMINSKI, 2013).

### Sais e pH

No passado, a disponibilidade de água pode ter auxiliado na criação de determinados estilos de cerveja em algumas regiões, mas hoje minerais podem ser removidos ou adicionados à água, para modificá-la. A suavidade e a delicadeza das cervejas da região da Boêmia (Alemanha) e, até certo ponto, das da região da Baviera (Alemanha), derivam da adição de uma pequena porcentagem de sais na água da região (RONALDO, 2009). A água de superfície penetra no subsolo e dissolve sais que podem afetar (ativos) ou ser inativos no processo de mosturação. Estes íons dissolvidos diferenciam-se em íons inativos e íons ativos, que reagem diferentemente com os componentes do malte e do lúpulo, figura 2 (KUNZE, 1999; BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

Os íons quimicamente inativos são aqueles que não entram em reação química com os componentes ativos do malte e do lúpulo, e permanecem inalterados na cerveja elaborada. Poderão entretanto, em maiores concentrações, delegar à cerveja propriedades positivas ou

negativas ao paladar. O teor em cloreto de sódio (NaCl) por exemplo, em determinada concentração, provoca uma característica que realça o paladar da cerveja. São exemplos desses sais, o cloreto de potássio (KCl), o sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e o sulfato de potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (KUNZE, 1999; PRIEST & STEWART, 2006).

Já os íons quimicamente ativos, são aqueles que reagem com os componentes do malte, afetando o pH da mosturação, influenciando na acidez da cerveja. Tais reações se processam durante a obtenção do mosto, conforme o estilo de cerveja elaborada, e em função da temperatura e pH de brassagem. Os sais sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>) por exemplo, em determinadas concentrações, provocam um amargor ao paladar da cerveja (KUNZE, 1999; SENAI, 2004; WUNDERLICH & BACK, 2009).

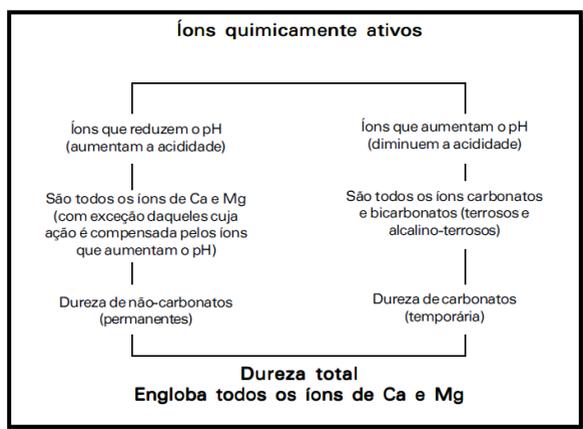
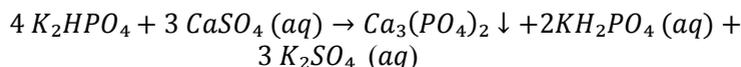


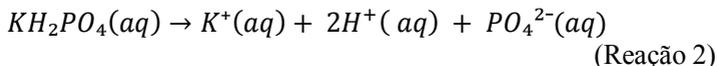
Figura 2. Íons quimicamente ativos (KUNZE, 1999).

Durante a liberação dos componentes do malte, podem ocorrer várias reações, dentre as principais: i) Entre o hidrogenofosfato de dipotássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) substância do malte e o sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>), de acordo com a reação (1):

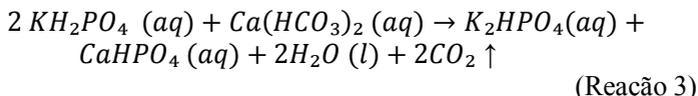


(Reação 1)

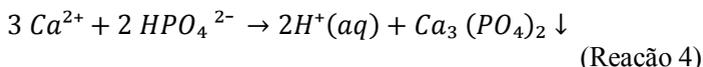
O fosfato de cálcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  formado é insolúvel. A presença dos íons cálcio, promove a liberação de íons  $\text{H}^+_{(\text{aq})}$  fazendo com que o pH da solução baixe, ii) o di-hidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) é ácido e conseqüentemente baixando o pH da solução, reação (2).



iii) Na reação 3, o bicarbonato de cálcio  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$  reage com o componente do malte di-hidrogeno fosfato de potássio, gerando o alcalino hidrogeno fosfato de di-potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), deixando o pH do meio básico.



iv) Íons cálcio e/ou magnésio ( $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ ) reagem com hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^-$ ), precipitando o fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), acidificando o meio, reação (4).



Os sais de cálcio e magnésio dissolvidos causam dureza na água. O grau de dureza da água nos informa a quantidade de sais solúveis (cálcio e magnésio) contidos em solução. A dureza da água pode ser dividida em duas categorias, a) Dureza temporária (devidos aos ânions carbonatos e bicarbonatos, associados aos cátions sódio, magnésio e cálcio) e b) Dureza permanente (devido aos ânions de sulfato, cloreto e nitrato com os cátions, magnésio e cálcio). A soma da dureza temporária e a dureza permanente compreende a dureza total da água (ESSLINGER & NARZISS, 2005).

Dureza da água é classicamente definida como unidades de dureza ou graus de dureza (grau hidrotimétrico). Em diferentes países a concentração dos referidos sais é dada em diferentes unidades relativo ao teor de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ), conforme as especificações da Tabela 2.

Tabela 2. Grau hidrotimétrico de diferentes países.

Alemanha	1°dH = 10 mg CaO/L	1g CaO/hL
França	1°fH = 10 mg CaCO <sub>3</sub> /L	1g CaCO <sub>3</sub> /hL
Inglaterra	1°eH = 14,3 mg CaCO <sub>3</sub> /L	---
EUA e Brasil	1°aH = 1 ppm	1mg CaCO <sub>3</sub> /L

**Fonte:** (KUNZE, 1999; SENAI, 2004; PRIEST & STEWART, 2006).

Uma classificação moderna de dureza de água é através da análise de dureza total a partir da titulação de EDTA com CaCO<sub>3</sub> (mmol/L). Sendo definida pela Tabela 3:

Tabela 3. Teores de dureza da água.

Dureza	CaCO <sub>3</sub>
Mole	1-130 ppm
Média	130-250 ppm
Dura	250-380 ppm
Super Dura	> 380 ppm

**Fonte:** (PRIEST & STEWART, 2006).

A denominação de dureza temporária provém do fato que, durante a fervura, uma parte dos bicarbonatos de cálcio e magnésio solúveis se convertem em carbonatos insolúveis (com eliminação do CO<sub>2</sub>), tornando a água relativamente mais branda (reações 3, 4, 5 e 6). O carbonato de magnésio permanece solúvel mesmo após fervura mais longa. A Tabela 4 demonstra os diferentes valores de produtos de solubilidade para os carbonatos de cálcio e magnésio, sendo que o último mesmo após fervura continua parcialmente em solução.

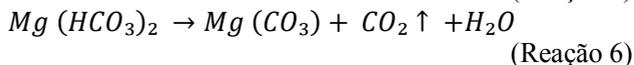
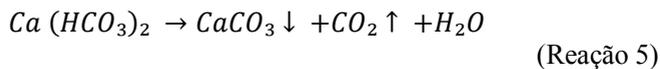


Tabela 4. Produto de solubilidade dos sais a 25 °C.

Produtos de Solubilidade a 25 °C	
Carbonato de Cálcio (CaCO <sub>3</sub> )	8,7 x 10 <sup>-9</sup>
Carbonato de Magnésio (MgCO <sub>3</sub> )	1,0 x 10 <sup>-5</sup>

**Fonte:** (ATKINS & JONES, 2006).

A denominação de dureza permanente ou dureza de não-carbonato é devida ao fato que mesmo durante a fervura os sais não se alteram no meio. Tanto os íons de dureza temporária, quanto os íons de dureza permanente, tem o efeito de alterar o pH da solução. O valor de pH (isto é, a concentração do íon  $H^+$ ), possui uma importante influência sobre a etapa de sacarificação, na qual haverá uma atuação otimizada das enzimas, Figura 3. A faixa de pH da água cervejeira deverá estar contida para a grande maioria dos estilos entre pH 5,2-5,5. Além desta faixa poderá ocorrer extração de compostos indesejáveis, como os polifenóis e taninos do malte. Um pH ideal potencializará a conversão do amido do malte, assim como a isomerização dos ácidos alfa do lúpulo, solubilização protéica e a coagulação entre proteínas e polifenóis com precipitação deste material mucilaginoso, conhecido como *trub* (KUNZE, 1999; SENAI, 2004; PRIEST & STEWART, 2006; CARVALHO, 2009).

O pH é dependente dos íons contidos no mosto cervejeiro, com significativo efeito no *flavour* da cerveja (PRIEST & STEWART, 2006). Para interferir no pH da mostura, da fervura e da cerveja, tem-se à disposição dois grupos de medidas a serem verificadas: A) Diretamente a composição da água cervejeira, a partir do tratamento inicial da água (e os métodos adequados ao tratamento); B) Incorporação de aditivos na sala de brassagem, tais como: i) adição de malte acidificado; ii) acidificação biológica, no mosto primário, com inóculo de bactérias lácticas à temperatura de 45 °C a 48 °C, na proporção de 0,5 % de mosto para redução em 0,1 na escala de pH; iii) adição de sulfato de cálcio na água cervejeira; e/ou iv) acidificação ou neutralização química da mostura com ácidos láctico, fosfórico, clorídrico ou sulfúrico (KUNZE, 1999; SENAI, 2004; PRIEST & STEWART, 2006).

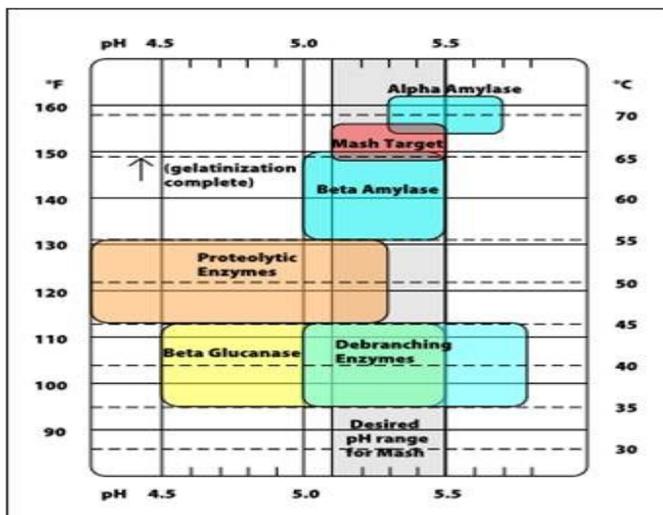


Figura 3. Demonstração gráfica da temperatura e pH com relação a atuação otimizada das enzimas (PALMER & HAMINSKI, 2013).

### 2.2.2. Lúpulo

Desde a origem da cerveja, na Antiguidade, os cervejeiros usavam aditivos para enriquecer o sabor, adicionar-lhe aromas, dar-lhe mais cor, aumentar teor alcoólico, conservar ou provocar seus efeitos inebriantes. A partir do século VIII, tornou-se comum em praticamente toda Europa a utilização de uma mistura de ervas chamada de *gruit*, que continha alecrim, artemísia, aquiléa, urze e gengibre para aromatizar a cerveja. O uso do lúpulo na produção de cerveja era comum desde o século IX, mas o primeiro registro, escrito em plena Idade Média, está no livro *Physica sive Subtilitatum*, da monja beneditina alemã Hildegard Von Bingen (1098-1179), a quem muitos autores chamam, equivocadamente, de Santa, embora nunca tenha sido canonizada. Apesar do seu amargor e do seu efeito inebriante, o lúpulo foi adotado porque suas propriedades de conservação foram logo percebidas. Como o processo de fermentação não era controlado, a produção de cervejas nos meses quentes era muito difícil, pois as altas temperaturas aceleravam o trabalho dos microrganismos presentes no ar e fermentavam mais rapidamente o produto. Portanto, qualquer

ingrediente ou processo que ajudasse a conservar o produto por mais tempo seria um grande diferencial para os cervejeiros (RONALDO, 2009).

Terceiro ingrediente na formulação da cerveja além da água e do malte, o lúpulo é utilizado em pequena quantidade: são necessários de 40 a 300 gramas de lúpulo para produzir 100 litros de cerveja. Diferentemente do malte, o lúpulo não altera o teor alcoólico nem o corpo da cerveja. Sua presença é fundamental para conferir à bebida o amargor característico da maioria das cervejas de qualidade. Os lúpulos também agem como um conservante para a cerveja e como uma peça principal na produção da sua espuma. Seus aromas com notas que variam do herbal, floral, frutado, condimentado, terroso e cítrico, fazem parte da essência de muitos estilos de cerveja.

A planta de lúpulo é uma trepadeira perene que pode ser fêmea ou macho, chega a medir entre cinco e sete metros de altura e produz um pequeno cone. Seu nome botânico é *Humulus lupulus*, cânhamo da família *Cannabinaceae* (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006; CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012), representado na Figura 4.

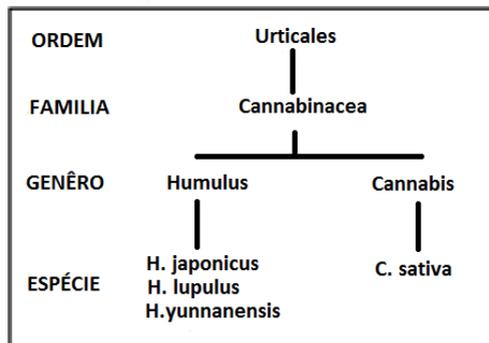


Figura 4. Classificação taxonômica do Lúpulo (PRIEST & STEWART, 2006).

Os lúpulos usados na cervejaria são os cones da inflorescência da planta fêmea, que muitas vezes são erroneamente referidas como flores, mas na verdade são corpos de frutificação tecnicamente conhecidos como estróbilos. Os cones de lúpulo contêm substâncias que são importantes na cervejaria, principalmente as resinas de lúpulo, que são contidas em organelas chamadas glândulas de lupulina. As plantas macho são usadas na reprodução do lúpulo, mas não tem nenhum uso na fabricação da cerveja. O lúpulo é uma planta noturna capaz de crescer dez centímetros por noite (HAAS, 2013).

A maior parte da produção de lúpulo ocorre entre os paralelos de latitude 35° e 55° (Figura 5). Por ser uma planta muito sensível ao clima e de difícil cultivo, suas características variam consideravelmente de acordo com o microclima de regiões mais frias (VENTURINI, 2010). Alemanha, Estados Unidos, China e República Checa produzem mais de 80 % do lúpulo mundial segundo a FAO (Food and Agricultural Organization) (RONALDO, 2009), (HAAS, 2013).

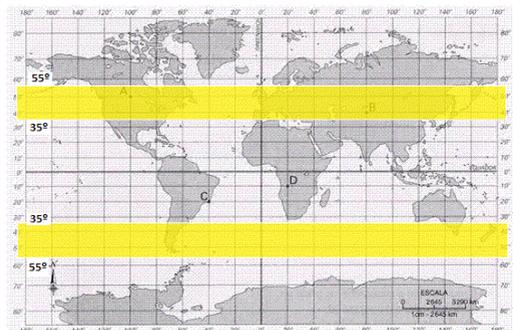


Figura 5. Regiões favoráveis ao cultivo de lúpulo, compreendendo as latitudes 35 a 55° dos hemisférios norte e sul (em amarelo). Adaptado pelo autor ([www.google.com.br/mapamundi](http://www.google.com.br/mapamundi)).

O lúpulo pode ser comercializado na forma de cones secos (*in natura*), pellets ou extratos, podendo ser classificados como lúpulos de aroma, amargor ou de duplo objetivo (HAAS, 2013). A Tabela 5 apresenta a composição química do lúpulo *in natura*.

Tabela 5. Composição química do lúpulo *in natura*.

Características	Porcentagem (%)
Resinas totais	12-22
Proteínas	13-18
Celulose	10-17
Polifenóis	4-14
Umidade	10-12
Sais Minerais	7-10
Açúcares	2-4
Lipídios	2,5-3,0
Óleos essenciais	0,5-2,0
Aminoácidos	0,1-0,2

**Fonte:**(VENTURINI, 2010) apud (Tschope, 2001).

Considerando que os lipídios, as proteínas e a celulose são substâncias insolúveis, enquanto os açúcares e os aminoácidos embora solúveis encontram-se em pequenas proporções, tais como (1,5-4,5 g/L) praticamente não contribuem com o processo cervejeiro. Portanto as substâncias minerais, os óleos essenciais, os polifenóis e as resinas amargas são as substâncias mais importantes e fundamentais ao processo (KUNZE, 1999; VENTURINI, 2010).

Os óleos essenciais, de lúpulo são uma mistura complexa de compostos voláteis, com perdas de 96 a 98 % no decorrer do processo cervejeiro (fase quente do processo), conferindo ao mosto e à cerveja o caráter aromático. Quatro são os componentes principais dos óleos essenciais: cariofileno; farnaseno; humuleno; mirceno (KEUKELEIRE, 2000). Combinados somam aproximadamente 60-80 % dos óleos essenciais da maioria das variedades. A quantidade desses constituintes e particularmente as proporções entre eles podem ser usadas como características para cada variedade. Estes compostos são todos hidrocarbonetos altamente voláteis e durante a fervura do mosto a maioria, se não todos, é evaporada, e assim eles contribuem pouco para o sabor e o aroma de lúpulo na cerveja. Alguns produtos de oxidação desses compostos, como os epóxidos de humuleno, são considerados como tendo contribuição positiva aos sabores da cerveja (HAAS, 2013). O mirceno, por exemplo, possui um forte impacto tanto no sabor (áspero) como no aroma (pungente) na cerveja. Por ser um óleo essencial volátil e fácil de ser oxidado quando exposto ao calor, o mirceno, é geralmente usado em *dry hopping* (KUNZE, 1999).

Os polifenóis são ricos em taninos de baixa massa molecular, como alguns importantes ácidos (ácido p-hidroxicumárico, gálico, felúrico, protocatequina e ácido cafeico) e componentes de cor como catequinas, flavonoides e antocianidinas (ESSLINGER & NARZISS, 2005) atuando como conservante da cerveja, evitando o envelhecimento e a perda do frescor da cerveja. Os polifenóis são encontrados nos ramos e brácteas do cone de lúpulo, Figura 6. Possuem sabor adstringente, reagem com proteínas causando turvações coloidais (*trub*) prejudicando características de espuma, sabor e cor da cerveja (HIERONYMUS, 2012).



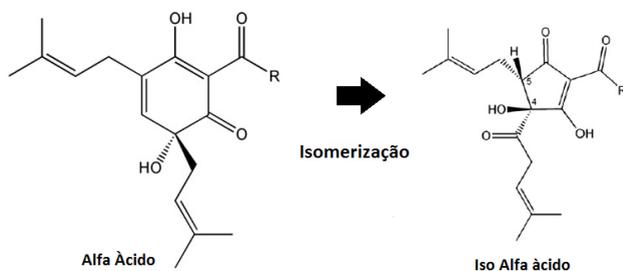
Figura 6. Desenho do cone de lúpulo à esquerda. 1) Cone integral do lúpulo; 2) Estrutura central; 3) Glândulas de lupulina; 4) Folhas; 5) Glândulas de lupulina (desenho ampliado). Corte transversal do cone do lúpulo à direita (WUNDERLICH & BACK, 2009; HIERONYMUS, 2012).

As resinas dos lúpulos são os componentes que dão características mais importantes ao lúpulo. Elas conferem gosto, melhoram a estabilidade da espuma e possuem propriedades bacteriostáticas. A mistura de ácidos e resinas de diferentes estruturas moleculares, gerados através dos processos de mostura, fervura e oxigenação, irão conferir o amargor para o produto final (KUNZE, 1999). Os componentes primários da resina de lúpulo são os alfa ácidos e beta ácidos encontrados nas glândulas de lupulina (KUNZE, 1999; HIERONYMUS, 2012).

Embora todas as variedades de lúpulo possam fornecer tanto amargor quanto aroma, o processo de seleção e as características químicas e de aroma entre esses dois tipos se tornaram cada vez mais díspares, e diferenciá-los ficou relativamente simples. A proporção beta/alfa ácido é a que diferenciá-los ficou relativamente simples. Relação beta/alfa alta, são lúpulos aromáticos e quando esta proporção é baixa, são lúpulos de amargor (LEA & PIGGOTT, 2003).

Os alfa ácidos são os componentes mais importantes da resina de lúpulo e são convertidos no processo de fabricação em iso-alfa ácidos (Figura 7), que são os componentes importantes do amargor da cerveja, sendo estes humuleno, cohumuleno e adhumuleno (HIERONYMUS, 2012). Os lúpulos de aroma são caracterizados por seu baixo conteúdo de alfa ácidos e um perfil de óleo essencial associado ao bom aroma, são geralmente usados como lúpulos de acabamento ou condicionamento. Estes lúpulos são cuidadosamente selecionados por sua qualidade de aroma característico, muitas vezes com baixo teor de cohumulona e uma taxa característica dos principais óleos essenciais, tais como humuleno, cariofileno e farneseno. Os alfa ácidos são tipicamente baixos, menos de

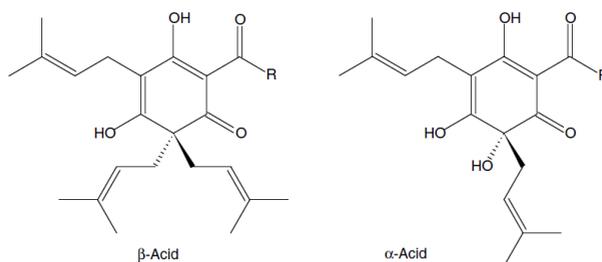
5 %. Os lúpulos de amargor possuem um nível muito mais alto de alfa ácidos e geralmente são adicionados na caldeira de fervura no início do processo, de maneira que o amargor seja extraído com mais eficiência. Os lúpulos de amargor possuem alfa ácidos acima de 6 % com um conteúdo de moderado a alto de cohumulona, com pouco aroma. À medida que o desenvolvimento de variedades de amargor com teor de alfa ácidos mais elevados foram desenvolvidas, ocorreu um aumento significativo na concentração de substâncias amargas nas variedades mais recentes, progredindo a partir do intervalo de 6 a 10 % e 13 a 18 % (HAAS, 2013).



Alfa ácidos	Grupo Funcional (R)	Iso-Alfa ácidos
Humuleno	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Iso-humuleno
Cohumuleno	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Iso-cohumuleno
Adhumuleno	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	Iso-adhumuleno

Figura 7. Fórmula molecular da estrutura de alfa ácido à iso alfa ácido e seus correspondentes grupos funcionais (R) (CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012).

Os beta ácidos (Figura 8) são o segundo componente mais importante da resina de lúpulo, não isomerizam como os similares alfa ácidos, sendo eles: lupuleno, colupuleno e adlupuleno (HIERONYMUS, 2012). A contribuição do amargor dos beta ácidos é devido à oxidação. Os beta ácidos possui excelentes qualidades antissépticas na cerveja, inibindo principalmente as bactérias Gram-positivas (KING & DUINEVELD, 1999), aumentando assim a vida de prateleira (CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012).



Beta ácidos	Grupo Funcional (R)	Alfa ácidos
Lupuleno	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Humuleno
Colupuleno	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Cohumuleno
Adlupuleno	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	Adhumuleno

Figura 8. Fórmula molecular das estruturas de beta ácidos e alfa ácidos e seus respectivos grupos funcionais (R) (PRIEST & STEWART, 2006).

Existe ainda uma terceira denominação, lúpulos chamados de “duplo objetivo”. Em algumas linhagens de lúpulo, ocorreu um efeito de cruzamento de variedades com teores mais altos de alfa ácidos com variedades de aromas finos, portanto, uma nova caracterização além dos lúpulos de aroma e amargor foi estabelecida, tanto contribui para aromas como também para o amargor da cerveja com seu alto teor de alfa ácido (HAAS, 2013).

Com as novas tecnologias aplicadas no processo de lupulagem, novos produtos tem sido desenvolvidos, como por exemplo, os extratos isomerizados, que permitem o ajuste de amargor pós-fermentação, e os extratos isomerizados e reduzidos, que permitem proteção contra luz e retenção de espuma. A utilização de um ou mais desses extratos resultantes do desenvolvimento tecnológico, ocorre em função das necessidades particulares de cada processo e do perfil que compõem cada tipo específico de cerveja. Por esse motivo, o processo de lupulagem torna-se parte integrante das formulações técnicas de uma indústria cervejeira, uma vez que afeta diretamente as características qualitativas do produto (VENTURINI, 2010).

Os lúpulos podem ser usados de várias formas na cervejaria. A forma mais simples é conhecida por diversos nomes que incluem lúpulos integrais, cones, frescos ou compactados. Uma ampla variedade de outros produtos de lúpulo está disponível, todos produzidos a partir de lúpulos integrais, por tecnologias especializadas e são usados em

numerosas aplicações de diversas maneiras. Nas cervejarias, o lúpulo e seus produtos são geralmente classificados em três categorias: A) Produtos de caldeira; B) Produtos de pós-fermentação; C) Produtos de *dry-hopping*.

A) Para os produtos de caldeira temos os i) lúpulos integrais, ii) lúpulos em pellets e iii) lúpulo em extrato.

i) Os lúpulos integrais são a forma mais simples de lúpulos. Também geralmente chamados de lúpulos em flor ou lúpulos compactados, são produzidos nas próprias fazendas a partir de cones de lúpulos frescos que são então secos e compactados. Lúpulos integrais têm uma série de desvantagens em relação a outros produtos de lúpulo, inclusive por serem perecíveis e volumosos, portanto caros para armazenar, transportar e manipular, além de não ser homogêneos, fazendo da amostragem e do controle do amargor um desafio. Também fornecem uma eficiência mais pobre que os outros produtos de lúpulo e requerem equipamentos especiais de cervejaria. Não obstante, os lúpulos integrais ainda são usados por muitos cervejeiros, pois alguns acreditam que a troca para produtos processados causaria uma mudança indesejável de sabor e aroma em sua cerveja ou que os lúpulos integrais são mais naturais e tradicionais, e que essas vantagens superam as desvantagens (HAAS, 2013).

ii) Na cervejaria os lúpulos em pellets são utilizados da mesma forma que os lúpulos integrais. Entretanto, devido o processo de pelletização e embalagem, os pellets de lúpulo são muito mais homogêneos e estáveis que os lúpulos integrais. Ao dosar o lúpulo na forma de pellets, a quantidade necessária é pesada e então adicionada à caldeira de fervura num cronograma prescrito pelo cervejeiro. Existem sistemas automatizados de dosagem que tornam o uso dos pellets de lúpulo a granel possível e vantajoso. Os pellets se desintegram facilmente no mosto fervente, liberando os ácidos de lúpulo no meio. Uma vez que a fervura do mosto esteja completa, o residual sólido de lúpulo é geralmente retirado junto com o *trub* no tanque de whirlpool em um decantador de mosto quente ou através de uma centrífuga. Existem dois tipos de pellets de lúpulos: T90 e o T45 (HAAS, 2013).

Os lúpulos em pellets tipo T90 (também chamados de normais ou pellets de lúpulo T90) são produzidos pela abertura dos fardos de lúpulos, separando todo material estranho, moendo o lúpulo em moinho de martelo, prensando o pó num pelletizador e embalando os pellets a vácuo ou atmosfera inerte. Os pellets T90 receberam originalmente esta denominação porque contem 90 % dos componentes originais do cacho e 10 % de substâncias verdes foram retiradas, como folhas, pedúnculo e

partes que não contenham alfa ácidos. Os pellets T90 são adicionados à caldeira para fornecer amargor e caráter de aroma de lúpulo à cerveja. Também podem ser usados para *dry hopping*. Os lúpulos em pellets T90 fornecem mais homogeneidade, melhor estabilidade de armazenamento e custos de armazenamento e transporte reduzidos em comparação aos cones de lúpulo. Geralmente, seu efeito no sabor da cerveja é idêntico ao proporcionado pelos lúpulos em flor dos quais tem origem (HIERONYMUS, 2012; HAAS, 2013).

Os pellets de lúpulo enriquecidos (também chamados de T45 ou pellets concentrados de lúpulo) são um produto de lúpulo de caldeira que fornece amargor e aroma a cerveja. Os ácidos amargos e os óleos de lúpulo são concentrados mecanicamente mediante a retirada de boa parte da porção fibrosa vegetativa do cone, enriquecendo assim o teor de lupulina. Os pellets do tipo T45 são chamados assim, pois, através desse enriquecimento, eles contêm 45 % dos componentes originais do cacho e 55 % de substâncias verdes foram retiradas, como folhas, pedúnculo e partes que não contenham alfa ácidos. O lúpulo T45 portanto possui mais alfa ácidos por peso que o T90 (HIERONYMUS, 2012; HAAS, 2013).

Pellets de lúpulo isomerizados (iso-pellets) podem muitas vezes servir como substituto para os produtos de amargor convencionais de caldeira, isto é, lúpulos em pellets ou extratos, com a vantagem de proporcionarem melhor eficiência na extração do amargor. Os iso-pellets são produzidos misturando lúpulo moído com uma pequena quantidade de óxido de magnésio, pelletizando então a mistura, embalando os pellets a vácuo como se faz com os pellets normais e finalmente aquecendo esses pellets já embalados a aproximadamente 50 °C por um período de uma a duas semanas. Os alfa ácidos são convertidos a seus sais de magnésio devido à oxidação do óxido de magnésio e são quase totalmente isomerizados durante o armazenamento a quente, com um consequente aumento significativo na utilização do amargor. Devido a esta maior utilização, os iso-pellets fornecem oportunidade de economia considerável no custo do lúpulo (muitas vezes sua eficiência chega ao dobro daquela proporcionada pelos pellets T90 ou T45) (PRIEST & STEWART, 2006; HAAS, 2013).

iii) Os extratos de lúpulos são produzidos por extração de material resinoso e oleoso encontrado nas glândulas de lupulina do lúpulo (alfa ácidos e óleos essenciais) em solventes orgânicos. O extrato de lúpulo muitas vezes mantém o aroma e amargor potencial dos lúpulos a partir dos quais é produzido. Devido a sua excelente estabilidade, o

extrato de lúpulo é uma alternativa conveniente e concentrada aos lúpulos em flor ou aos pellets (HAAS, 2013).

O solvente dominante utilizado em todo o mundo para a extração dos lúpulos é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), especialmente no estado de um fluido supercrítico e, em menor escala, no seu estado líquido. Seja com métodos de extração supercríticos ou com  $\text{CO}_2$  líquido todos os componentes da resina de lúpulo que interessam ao cervejeiro são extraídos dos lúpulos originais. No entanto, diferentemente da extração supercrítica, o processo de  $\text{CO}_2$  líquido não extrai clorofila e outros pigmentos. O extrato de lúpulo de  $\text{CO}_2$  contém os alfa ácidos, beta ácidos, óleos essenciais e outros componentes de resina de lúpulos. O extrato pode ser comercializado como resina não diluída (geralmente chamado de extrato de resina pura), com um teor de alfa ácidos de 30 % a 65 %, dependendo das características dos lúpulos originais. Além disso, a resina poderá ser padronizada para um conteúdo específico de alfa ácidos, usando-se xarope de milho ou outro xarope como diluente. Os extratos de lúpulo de  $\text{CO}_2$  têm muitas vantagens sobre os outros produtos de caldeira (HAAS, 2013). São eles:

- I. A forma mais estável do lúpulo. Os extratos de resina pura podem ser armazenados por vários anos em temperatura ambiente com insignificante perda de valor na fabricação de cerveja;
- II. A utilização de extratos de lúpulo na caldeira é melhor que outros tipos tradicionais de lúpulos de caldeira (ausência de formação de *Trub*);
- III. Os extratos de lúpulo são extremamente uniformes. O conteúdo de alfa ácidos é cuidadosamente ajustado às especificações do cliente na unidade de processamento para obter a consistência ideal;
- IV. O transporte, o peso de armazenamento e volume são consideravelmente mais baixos, pois apenas o material de extrato (geralmente 20-25 % do material original do lúpulo para lúpulos com alto teor de alfa ácidos) é mantido e embalado (KUNZE, 1999; HAAS, 2013).

O extrato isomerizado não necessita de aquecimento para se solubilizar e isomerizar. O extrato de caldeira isomerizado (IKE) é produzido pelo aquecimento do extrato de resina pura com  $\text{CO}_2$  com um catalisador de magnésio (por exemplo, carbonato de magnésio), sob condições controladas, que converte os alfa ácidos em ácidos iso-alfa com uma transformação superior a 95 %. Os iso-alfa ácidos em IKE

estão em sua forma de ácido livre juntamente com o seu complemento total de óleos de lúpulo. O IKE pode ser usado como uma alternativa aceitável aos lúpulos em flor, em pellets ou extrato de CO<sub>2</sub> na caldeira. Todas as propriedades de fabricação são semelhantes ao extrato de CO<sub>2</sub> convencional, mas a eficiência da utilização de iso-alfa ácidos é significativamente maior. Tal como o cuidado dado aos iso-pellets, os óleos de lúpulo em IKE podem ser modificados a partir da sua forma original pelo processo de isomerização. Assim ele pode ser dosado depois do processo de fabricação e, portanto, não sofre perdas na brassagem, fermentação e maturação, podendo ser utilizado em qualquer etapa do processo (HAAS, 2013).

B) Dentre os produtos de pós-fermentação, temos os componentes de i) aroma e ii) amargor.

i) Os óleos essenciais de lúpulo são a fonte de aroma de na cerveja, mas obter e controlar o aroma desejado são os desafios mais difíceis em uma cervejaria (KING & DUINEVELD, 1999). Existem dois tipos básicos de aroma em cerveja, o primeiro é chamado aroma de lúpulo seco e o segundo aroma de lúpulo de caldeira (também classificados de modo diferente como aromas finais e de lúpulo nobre). O aroma de lúpulo seco é dado pelo complemento total de óleos essenciais adicionados no final do processo de fabricação sendo caracterizado por um traço robusto, parecido com lúpulo fresco. O aroma de lúpulo de caldeira é mais difícil de se obter, porque muitos dos componentes dos óleos não permanecem na cerveja finalizada quando a lupulagem de caldeira é utilizada, e os óleos podem ser modificados significativamente durante o processo de fabricação. A maior parte do óleo volátil é rapidamente removida por destilação a vapor durante a fervura e sai pela chaminé. Ocorrem eliminação e segregação adicionais durante a fermentação quando esses compostos que sobrevivem no mosto são arrastados pelo CO<sub>2</sub> desprendido na fermentação, ou através de modificações químicas, tais como transesterificação, hidrólise e redução. Assim, alguns dos componentes de aroma de lúpulo na cerveja terminada são artefatos produzidos durante o envelhecimento ou durante a fervura e fermentação. O uso de uma variedade de lúpulo conhecido por ter um aroma fino e a adição de lúpulos aromáticos próximo ao final da fervura permanece como as principais recomendações para obtenção de um aroma de qualidade de lúpulo de caldeira (HAAS, 2013).

ii) A utilização de lúpulos de amargor numa cerveja terminada deve ser cuidadosa para evitar a formação de aromas indesejáveis de oxidação. A incorporação de oxigênio em cervejas acabadas provoca reações químicas indesejáveis, refletindo em mudanças no sabor e

aroma e tempo de prateleira (CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012). Outro processo oxidativo muito conhecido no meio cervejeiro é o *light struck*. Este processo de fotocatalise acontece quando a cerveja é exposta à luz. Essa causa provém da vulnerabilidade dos iso-alfa ácidos à luz (faixa de ultravioleta entre 350-500 nm). A confirmação da degradação é obtida pela geração do produto, 3-metil-2-buten-1 tiol (3MBT) (Figura 9) (KING & DUINEVELD, 1999; HAAS, 2013).

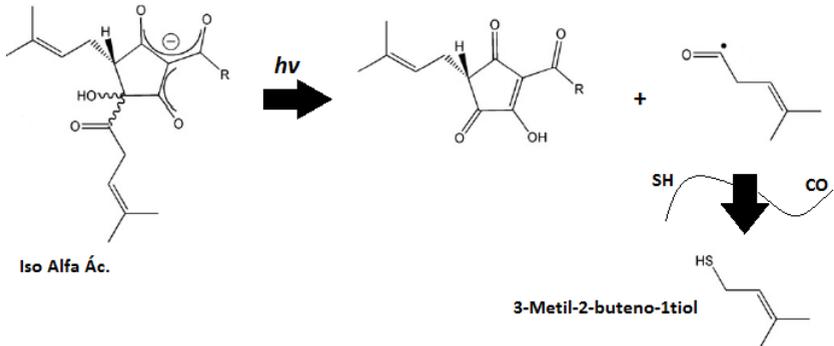


Figura 9. Formação do composto (3-MBT) com exposição à luz (HAAS, 2013).

A formação deste produto com a exposição à luz pode ser prevenida com envasamento em garrafas marrons que não são transparentes a comprimentos de onda no ultravioleta (280-320 nm) (CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012). Outra opção é fazer com que os iso-alfa ácidos sejam resistentes à luz através de pequenas mudanças na estrutura molecular, em um processo chamado redução (Figura 10). Para a prevenção dessa reação o uso de produtos reduzidos devem ser usados principalmente quando a cerveja é envasada em vidro claro ou verde, que são transparentes aos raios de luz. Como acontece com todos os produtos reduzidos, a estabilidade à luz na cerveja é alcançada apenas na ausência completa de iso-alfa ácidos (CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012; HAAS, 2013).

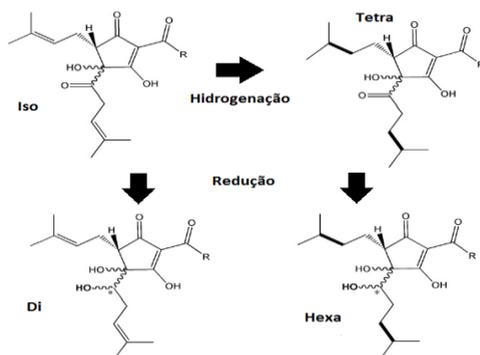


Figura 10. Formação de isohumulonas reduzidas. Ácido iso-alfa, Ácido Tetrahidro-iso-alfa, Ácido dihidro-iso-alfa e Ácido hexahidro-iso-alfa (CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012), (HAAS, 2013).

C) Alguns cervejeiros tentam preservar parte dos aromas de lúpulos em seus produtos finais. Para esta conservação deve-se adicionar os lúpulos mais próximos ao final da fervura. No final da fervura os lúpulos adicionados conferem mais aroma a cerveja, devido aos seus óleos aromáticos não se volatilizarem tanto. A técnica de dry-hop consiste na adição dos lúpulos na parte final da fermentação ou ao longo da maturação, conservando o máximo dos óleos aromáticos. Os lúpulos podem ser adicionados na cerveja sob três formas: flor, pellets e extrato. A forma de flor é pouco usada pelo mundo devido ao fato da flor se oxidar rapidamente perdendo suas propriedades. Já na forma de extrato é mais apropriado para grandes cervejarias visto que o extrato é bem concentrado necessitando o uso integral após abertura do frasco. A forma mais usada entre os microcervejeiros é na forma de pellets, essa forma condensada e densa, dificulta a ação do oxigênio no lúpulo sendo de fácil armazenamento (LEA & PIGGOTT, 2003; CABALLERO, BLANCO *ET AL.*, 2012; HAAS, 2013).

### 2.2.3. Cevada

Segundo ingrediente em quantidade após a água, a cevada é o cereal mais indicado na fabricação da cerveja. O cultivo da cevada no Brasil é uma importante opção para os produtores da região sul, sendo o clima temperado como o mais propício para a produção (SOARES, 2003). A área cultivada no Mundo é de 530.000 km<sup>2</sup>, e no Brasil fica em torno de 123.000 hectares (EMBRAPA, 2018).

Pertencente à família das gramíneas, produz frutos secos chamados cariópsides ou grãos, do gênero *Hordeum*, a espécie é dividida em duas sub-espécies: *Hordeum vulgare* cevada de seis fileiras e *Hordeum distichon* cevada de duas fileiras. O grão de cevada, assim como o de arroz e de aveia, é colhido com a casca intacta que consiste da lema e palea (PRIEST & STEWART, 2006).

A cevada é uma grande fonte de amido, e sua composição varia conforme a espécie (PRIEST & STEWART, 2006). As principais diferenças entre as duas espécies podem ser visualizadas no Quadro 1.

Quadro 1. Correlações entre duas espécies de cevada.

<b>Cevada de 2 Fileiras</b> <b>(<i>Hordeum distichon</i>)</b>	<b>Cevada de 6 Fileiras</b> <b>(<i>Hordeum vulgare</i>)</b>
Espiga achatada	Espiga cilíndrica
Geralmente cevada de primavera	Geralmente cevada de inverno
Formação uniforme	Formação irregular
Cascas finas	Cascas grossas
Maior teor de extratos	Menor teor de extratos
Menor teor de proteínas	Maior teor de proteínas
Menor potencial enzimático	Maior potencial enzimático
Maior rendimento amido/grão	Menor rendimento amido/grão

**Fonte:** (PRIEST & STEWART, 2006).

As características composicionais desejáveis da cevada cervejeira, de duas ou de seis fileiras, são: alto conteúdo de amido (~ 61 %), baixo teor de proteínas (< 11,5 %) e  $\beta$ -glucanas (3,3-4,5 %) (KUNZE, 2014).

A cevada é a matéria-prima principal para a fabricação da cerveja. Várias razões indicam a cevada como o melhor cereal a ser utilizado no processamento de elaboração do malte e da cerveja. A justificativa da escolha do grão de cevada se deve aos fatores apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Relações benéficas de escolha da cevada.

Boa relação amido/proteína
Boa condução na germinação
Cascas proteção do grão e camada filtrante
Elevada formação e ativação enzimática
Fácil gelatinização do amido
Pouco teor de lipídios
Características ao paladar (aroma)

**Fonte:** (KUNZE, 2014)

A formação e desenvolvimento do grão de cevada são resultados de uma série de eventos morfológicos e bioquímicos integrados. A faixa de duração do crescimento do grão, bem como a composição final e qualidade do mesmo, são influenciados pelas condições genéticas e ambientais. Estas incluem: temperatura; duração do dia; suprimento de água; disponibilidade de minerais no solo. A fonte de reserva da cevada é o amido. A quantidade de amido varia entre 60-75 % do peso do grão. É encontrado na forma de grânulos, os quais são formados nos plastídios das plantas chamados de amiloplastos. Na cevada cada um dos plastídios contém apenas um grânulo de amido, pois este cereal contém grânulos de amido simples. O amido é um polímero de D-glicose (6 carbonos) com ligações glicosídicas. A polimerização do amido resulta em duas conformações estruturais distintas. A amilose, contendo cerca de 20 % de uma fração solúvel em água, com ligações do tipo (alfa 1-4), e a amilopectina, contendo aproximadamente 80 % do amido, sendo esta insolúvel em água (Figura 11), com ligações do tipo alfa (1-4 e 1-6) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

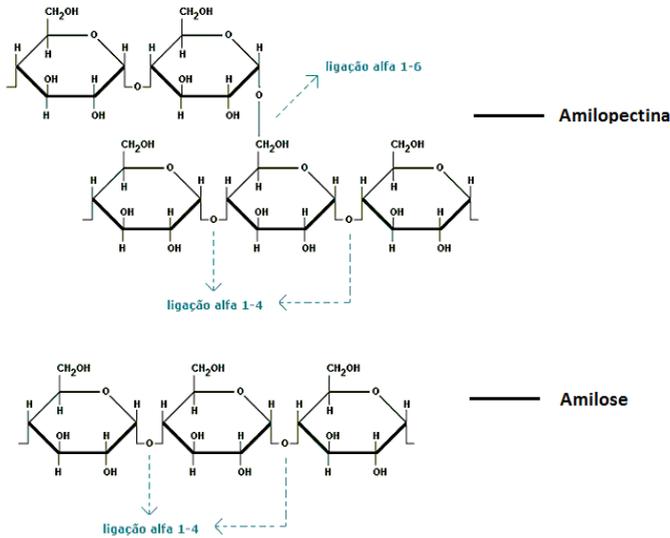


Figura 11. Representação das estruturas moleculares da amilopectina (com ligações do tipo: alfa 1-4 e 1-6) e da amilose (com ligações do tipo: alfa 1-4).

Ambas as frações correspondem aos carboidratos de peso molecular elevado e fórmula  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Por tratamento ácido ou pela ação de enzimas, os componentes do amido se hidrolisam lentamente, originando dextrina (uma mescla de polissacarídeos de baixo peso molecular), maltotriose, maltose e glicose. Tanto a amilose, como a amilopectina, estão constituídas por unidades de glicose, porém diferem em tamanho e estrutura molecular (LEA & PIGGOTT, 2003; BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

Outro grupo importante na constituição da cevada são as proteínas. As proteínas na cevada estão organizadas em dois grupos: de armazenamento e não-armazenamento, baseados na sua localização e função do grão. As proteínas de armazenamento localizadas no embrião são peptídios e aminoácidos (FAN), incluindo as hordeínas (prolaminas) e globulinas. Já as proteínas de não-armazenamento são proteínas estruturais e enzimas, que inclui albuminas, gluteínas e globulinas. Durante o processo de maltagem a matrix proteica localizada no endosporma é hidrolisada em polipeptídios, oligopeptídios e aminoácidos livres. Estas proteínas são uma mistura de hordeínas (prolaminas) e em uma menor extensão, gluteínas. As hordeínas são os componente primários da matrix proteica em torno dos grânulos de

amido, sendo que durante a germinação fornece majoritariamente FAN para o mosto cervejeiro (MALLETT, 2014).

A cevada de uso nas cervejarias é chamada de cevada cervejeira ou malte de cevada, podendo ser utilizada a cevada de 2 fileiras ou 6 fileiras, passando por um processo artificial chamado, maltagem. A malteria é a fábrica onde o grão de cevada é beneficiado e o resultado deste beneficiamento tem-se o malte de cevada. As transformações provocadas pelo processo de malteação estão sintetizadas na Tabela 6, na qual podem ser observadas as diferenças entre a cevada bruta e o malte de cevada, caracterizando um processo de modificação do grão bem sucedido (VENTURINI, 2010).

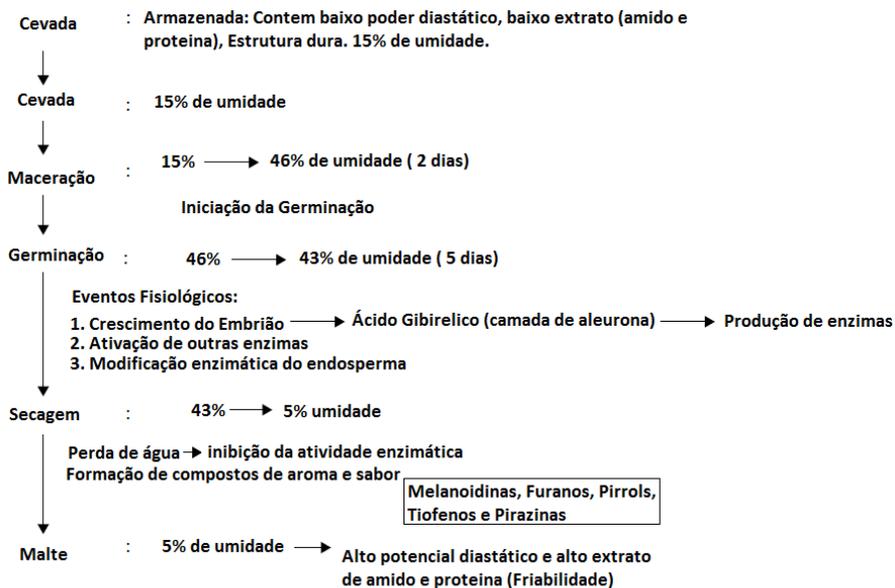
Tabela 6. Composição do grão de cevada e do malte.

<b>Características</b>	<b>Cevada</b>	<b>Malte</b>
<b>Massa do grão (mg)</b>	32-36	29-33
<b>Umidade (%)</b>	10-15	4-6
<b>Amido (%)</b>	55-60	50-55
<b>Açúcares (%)</b>	0,5-1,0	8-10
<b>Nitrogênio Total (%)</b>	1,8-2,3	1,8-2,3
<b>Nitrogênio Solúvel (% N total)</b>	10-12	35-50
<b>Poder diastásico (°Lintner)</b>	43	53
<b><math>\alpha</math>-amilase, unidades de dextrina</b>	Traços	30-60
<b>Atividade proteolítica</b>	Traços	15-30

**Fonte:** (VENTURINI, 2010)

O processo de malteação tem como objetivo simular a germinação do grão, porem com parâmetros bem controlados. Os principais controles para uma boa condução germinativa, são: oxigenação, umidade, temperatura, tempo e produção de gás carbônico. Entende-se assim que malteação é um processo naturalmente

controlado, que visa o desenvolvimento do grão de forma integral. Porém para uma boa qualidade do malte de cevada, o grão não poderá germinar ao ponto de se tornar uma nova planta. Por este motivo que a germinação do grão se faz de forma controlada, sendo interrompida sua germinação na etapa de secagem. São 3 etapas na qual o grão de cevada é submetido até o ponto de malte. Estas etapas ou fases compreendem: maceração, germinação e secagem, representadas pelo Esquema 1 (PRIEST & STEWART, 2006).



**Esquema 1.** Resumo do processo de malteação (PRIEST & STEWART, 2006), adaptado pelo autor.

A maceração é a primeira etapa na qual se prepara o grão, para a etapa de germinação. Nesta fase a absorção de água ocorre a partir da base do grão onde se localiza o embrião e em menor parte as laterais e extremidade superior. Por este motivo as diversas partes do grão apresentam inicialmente diferentes teores de umidade, se igualando com o tempo (REINOLD, 2015). Inicialmente o grão vem do campo com teores de umidade em torno de 12 % a 15 %. O objetivo da maceração é fornecer água para o grão de cevada, para que ele tenha possibilidade de iniciar a germinação. Nesta etapa alguns parâmetros são necessários

como: constituição da cevada, estrutura do grão, potabilidade e temperatura da água a ser utilizada (14 °C-22 °C) e o tempo em que a cevada ficará imersa em água (REINOLD, 2015). Outro ponto importante, na fase de maceração, é a limpeza dos grãos. Os grãos provêm das plantações, transportes e silos graneleiros, que acumulam muitas impurezas, como: poeira, cascas (fungos), palha, e outros. Assim se faz necessária a limpeza dos grãos antes da malteação, no processo chamado de lixiviação. Em muitos aspectos a etapa de maceração é uma etapa crítica no processo de malteação. Para produzir um malte homogêneo, é necessário alcançar igual conteúdo de umidade em todo o grão. A taxa de respiração aumenta consideravelmente com o aumento do conteúdo de umidade do grão. Para evitar a deficiência de oxigênio na água de maceração (anaerobiose) esta deve sofrer aeração. A aeração além de promover a renovação do oxigênio da água, remove o dióxido de carbono e etanol que são substâncias inibidoras da germinação. O grão de cevada chega na malteria com umidade em torno de 12-15 % e durante a maceração o objetivo é aumentar esta umidade em torno de 45-46 % (MALLET, 2014; REINOLD, 2015).

Na germinação, o objetivo é tornar as substâncias de reserva do grão suscetíveis as hidrólises por enzimas sintetizadas, sendo as mais significativas para o processo de brassagem as alfa e beta amilases, proteases e glucanases. O endosperma da cevada, representado pela Figura 12-B, é o maior depósito de energia do grão, contém grânulos de amido em uma matriz de proteína rodeada por paredes celulares (Figura 12-E) e aprisionadas por um envoltório fibroso maior, rico em celulose, pentosanas, lignina e fenólicos, a casca (Figura 12-D). As enzimas, por sua vez, são sintetizadas na camada de aleurona (Figura 12-C), através da absorção de água pelo embrião (Figura 12-A), que tem a função de produzir ácido giberélico, um hormônio vegetal que promove a germinação do vegetal. Induzida pelo ácido giberélico, a camada de aleurona (Figura 12-C) produz alfa-amilase, beta-glucanase e endoprotease que são as enzimas responsáveis pela degradação do endosperma (Figura 12-B) durante a maltagem (BAMFORTH, C. W., 2003).

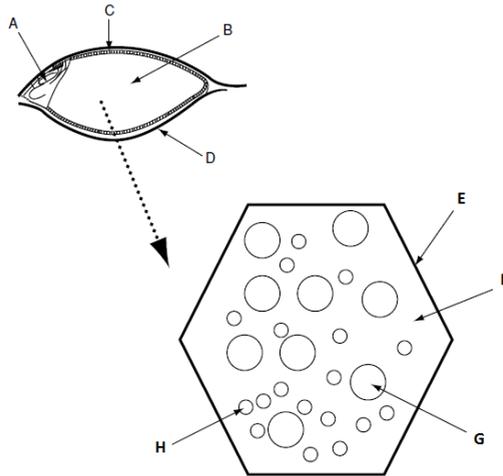


Figura 12. Corte longitudinal do grão de cevada: A-embrião; B-endosperma; C-camada aleurona; D-casca. Ampliação da estrutura celular do endosperma: E-parede celular (75 % de beta glucanos e 20 % de arabinoxilano); F-proteínas; G-H- grande e pequenos grânulos de amido. Adaptado de (BAMFORTH, C. W., 2003).

A degradação das paredes celulares ricas em beta glucanas e arabinoxilanas (Figura 12-E) é de extrema importância para a fabricação de cervejas, pois permitirá o acesso das enzimas ao amido, influenciando no rendimento. Mais ainda, influenciará na velocidade de filtração do mosto e da cerveja, além de poder provocar turvação. As proteases dissolvem a membrana de proteína (Figura 12-F) que envolve as células de amido e enzimas citolíticas que promovem o desdobramento da parede de hemicelulose, disponibilizando assim, os grânulos de amido inseridos na matriz proteica, permitindo o acesso aos grânulos de amidos grandes e pequenos (Figura 12-G e H) (BAMFORTH, C. W., 2003; LEA & PIGGOTT, 2003).

A intensidade e o uso dos parâmetros de germinação são conduzidos por meio da umidade, temperatura, relação  $O_2/CO_2$ , tempo e ativadores/inibidores de germinação, pois permitem influenciar o potencial enzimático e o grau de modificação do malte. O processo de germinação, ou seja, elaboração do malte verde (como denominado após a etapa de germinação) é caracterizada pelas seguintes fases:

- Desenvolvimento embrionário, que consiste no crescimento e desenvolvimento da radícula e do foliculo;
- Formação e ativação enzimática;
- Transformações das substâncias de reserva.

O malte verde segue então para etapa de secagem, onde se reduzirá a quantidade de umidade. Para uma boa qualidade de secagem do malte verde algumas análises são feitas para uma melhor execução da tarefa seguinte, conforme Quadro 3.

Quadro 3. Análises típicas do malte verde.

Odor = Típico;  
 Aspecto = Sem presença de fungos, grãos danificados e desprendimento excessivo das radículas;  
 Crescimento da radícula e do foliculo. = uniformidade e comprimento (3/4 a 7/8) do tamanho do grão.

Fonte: (MALLETT, 2014)

A secagem é o último processo dentro da malteria. A secagem do malte verde tem grande influência na qualidade da cerveja produzida. Portanto, o uso de uma cevada apropriada e ajustes ao longo dos processos de maceração e germinação, terão uma influência fundamental para a fabricação do malte que se deseja. Os objetivos da secagem do malte verde são os seguintes:

a) Conservação: Após a sua secagem de 43 % à 5 % de umidade, o malte pode ser armazenado por períodos superiores há 06 meses sem perda considerável de suas características;

b) Desenvolvimento de Aroma e cor: Durante a secagem ocorrem reações entre substâncias existentes no malte que contribuem para a formação de cor e aroma. As duas principais reações que ocorrem são a de caramelização de açúcares e de Maillard que ocorre entre açúcares e proteínas;

c) Retirada da radícula: Com a secagem do malte verde a radícula se torna quebradiça facilitando a sua retirada. A retirada da radícula é de fundamental importância, pois poderia transmitir gosto adstringente à cerveja (MALLETT, 2014).

A seleção de diferentes processos de malteação e secagem, produzirão diferentes tipos de maltes, conseqüentemente cores e aromas variados (REINOLD, 2015). Maltes com temperaturas de secagem em

torno de 80 °C darão origem a maltes bases, ou seja, maltes com alto poder enzimático, levando a uma maior proporção na formulação de cerveja, estão entre eles: Malte tipo Pilsen, Malte tipo Pale Ale e Malte tipo Vienna. Para temperaturas de secagem mais altas, em torno de 150-200 °C, darão origem a maltes e cervejas mais escuras, porém com perdas no potencial enzimático. Neste caso a ideia é confeccionar diferentes sabores e aromas, como por exemplo: Malte tipo Carahell, Malte tipo Carared, Malte tipo Carafa II, Malte tipo Chocolate, Malte tipo Black, com tons de cor alaranjada, seguindo para vermelho, castanho, marrom e chegando num tonalidade preta, respectivamente.

O tratamento do malte após secagem (~80 °C) compreende o resfriamento para evitar a perda da ação enzimática, aumento da cor e alteração no paladar da cerveja, assim como o polimento do malte, eventual retirada de radículas, partículas de cascas e pó (REINOLD, 2015). Importantes fatores são atribuídos às modificações do malte: estabilização biológica do cereal para transporte e armazenamento, redução da quantidade de água, fornecimento de aroma, cor (reações de Maillard) e paladar (LEA & PIGGOTT, 2003).

#### 2.2.4. Adjuntos Cervejeiros

Os adjuntos cervejeiros são matérias primas rica em carboidratos (carboidratos de grande cadeia molecular ou carboidratos de pequena cadeia molecular), utilizadas na forma complementar ao malte, que podem conferir a cerveja uma qualidade característica (PRIEST & STEWART, 2006), além de proporcionar uma maior rentabilidade do processo de fabricação, seja pelo menor valor ou maior produtividade (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). O principal objetivo no uso de adjuntos cervejeiros é na obtenção do extrato (sendo este fermentável ou não) para elaboração de cervejas, que dependendo da quantidade, não comprometerá o processo de brassagem (KUNZE, 1999; PRIEST & STEWART, 2006).

Dentre os complementos utilizados pelas grandes cervejarias estão o milho e o arroz. A justificativa no uso de adjuntos cervejeiros está na elaboração de cervejas mais leves comparadas às elaboradas com puro malte, melhoria na estabilidade coloidal que aumenta a vida de prateleira do produto, armazenagem e manuseio simples e redução de custos (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Em vários países a substituição parcial do malte por adjuntos na fabricação de cerveja é permitida por lei, sendo vários os tipos de matérias-primas autorizadas.

No Brasil, o Decreto nº 6.871 de 04 de junho de 2009, Capítulo IV “Da padronização das bebidas”, Seção 3 “Das bebidas alcoólicas fermentadas”, art 36, define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica de mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009a).

Parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos, isto é, cereais maltados ou não (cevada, arroz, trigo, centeio, milho, triticale, aveia e sorgo, integrais, em flocos ou a sua parte amilácea) e por carboidratos de origem vegetal sendo este transformado ou não. Existem três possíveis formas de inserir adjuntos no processo cervejeiro: i) Adjuntos de fonte amilácea parcialmente germinados, que podem ser cozidos junto com a cevada maltada, numa mesma tina de mostura, como trigo, centeio e sorgo. ii) Adjuntos de fontes amilácea não germinados, que deverão ser cozidos, em uma tina de mostura diferente da tina principal de brassagem, até a total gelatinização do amido, como batata, mandioca, milho, arroz e pinhão. iii) Adjuntos de fontes açucaradas, são dissolvidos no momento da fervura, como xarope de milho, caldo de cana e *high* maltose (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Cada empresa define a proporção de malte e adjunto em seus produtos, conforme lhe convém, porém deve-se observar o limite máximo permitido pela legislação, item 2.1.5 da instrução normativa nº 54, de 5 de novembro de 2001, na qual diz “a utilização do adjunto não poderá ser superior a 45 % em relação ao extrato primitivo” (BRASIL, 2001). Além disso, o seu uso abusivo pode resultar em uma cerveja pouco encorpada, descaracterizando o produto final (SLEIMAN, FILHO *ET AL.*, 2010).

Nos últimos anos tem-se destacado duas formas em se produzir cervejas, as produzidas com mosto de alta densidade específica e as produzidas com adjuntos especiais, os quais podem aromatizar ou não as mesmas (CARVALHO, 2009). A elaboração de cervejas especiais usando novos adjuntos vem se tornando um diferencial nas microcervejarias brasileiras, podem ser utilizados mandioca, batata, banana, beterraba, pupunha, pinhão, caldo de cana, chocolate e frutas tropicais como limão, cereja, morango, abacaxi, kiwi e maçã (VENTURINI, 2010).

Exemplo de grande sucesso no Brasil e exterior está no pioneirismo das microcervejarias Colorado, Bodebrown e Way Beer, na qual encontramos cervejas com produtos diferenciados em suas composições e formulações. O incremento do mel, café, mandioca, rapadura, cacau, castanha-do-pará, uva, chocolate, cascas de laranja,

semente de coentro, pimenta rosa e gabioba são alguns dos adjuntos que estão presentes (PARRA, 2015a).

#### 2.2.4.1. *Araucária angustifolia*

Um interessante adjunto para pesquisa e de grande uso na culinária regional é a semente da árvore da *A. angustifolia* (Figura 13).



Figura 13. Pinha (sementes da *Araucária angustifolia*) contendo pinhões (SPADA, 2011).

Esta semente é utilizada cozida ou assada, em pratos regionais como farofas, entreveros e paçocas (CONAB, 2014). Além do emprego do pinhão em alimentos, a semente pode ser utilizada na produção de bebidas, como a cerveja. O pinhão apresenta um valioso teor nutricional e energético, composto por aproximadamente 50 % de amido em base úmida (MUCCILLO, 2009) e aproximadamente 72 % de amido em base seca (DAUDT, KÜLKAMP-GUERREIRO *ET AL.*, 2014), além de frações de proteínas, lipídios e compostos fenólicos (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006), podendo ser considerado uma fonte de fibras, vitaminas do complexo B, cálcio, fósforo, magnésio e cobre (Tabela 7), constituindo assim num alimento de grande importância na segurança alimentar, principalmente das comunidades rurais da região serrana de Santa Catarina (CONAB, 2014). A casca do pinhão tem sido estudada para limpeza de água de efluentes, na remoção de cor e metais pesados como o cromo (GUARDA, 2006).

Tabela 7. Composição (%) de pinhão por 100 gramas de parte comestível (Pinhão Cozido), algumas referências importantes.

	Unicamp	Cordenunsi	Gama	Taco
Umidade	50,0	50,3	45,7	51,0
Carboidratos	43,9	34,4	Nd	43,0
Proteínas	3,0	2,3	7,6	4,0
Lipídios	0,7	1,2	2,9	1,0
Fibras	15,6	5,7	17,3	15,6
Cinzas	1,8	1,4	2,2	1,8

**Fonte:** (CAPELLA, 2008),(NEPA, 2006)

Embora a principal fonte de estocagem das sementes de *A. angustifolia* seja o amido, as proteínas e os lipídios também compõem uma importante fonte de reserva. Tais teores variam de acordo com o estado de desenvolvimento das sementes e condições edafoclimáticas (temperatura, irrigação e característica genética da espécie), sendo que o acúmulo dos nutrientes ocorre na desidratação da semente nas etapas finais de maturação entre os meses de abril a maio, quando os valores de proteínas podem variar de 8 até 15 % (CAPELLA, 2008).

O amido do pinhão pode ser facilmente isolado sem adição de qualquer aditivo, porém na sua forma nativa tem limitadas aplicações industriais (KLEIN, PINTO *ET AL.*, 2013). Com emprego de novas tecnologias, o uso do amido pode ser obtido por processos físicos, químicos e enzimáticos, sendo utilizados nos setores de alimentos como estabilizantes de leite fermentado, sorvetes, queijos, produtos cárneos, na indústria farmacêutica (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007) como espessantes de molhos, em artigos de pastelaria, fabricação de bolos e em caldos diversos (ALMEIDA, 2010).

Atualmente o mercado cervejeiro brasileiro abre-se para novos gostos e sabores, a ideia em inserir um novo produto na alimentação da população da região sul e Brasileira, está em fortalecer ainda mais os projetos já existentes, relacionados ao cultivo e a cadeia que envolve o pinhão. Em destaque está a ECOSERRA (Cooperativa Ecológica dos Agricultores, Artesãos e Consumidores da Região Serrana), localizada

no município de Lages-SC, que atualmente contribui para promoção da sócio-biodiversidade com ênfase no pinhão e desenvolvimento sustentável das comunidades rurais da região serrana de Santa Catarina-SC (NIEHUES, 2008; SARTORI, 2010; REIS, 2013; CONAB, 2014).

O amido é suscetível à hidrólise ácida e enzimática por ação de enzimas fúngicas ou do malte. Pela ação do malte são quebradas as ligações alfa 1,4 com formação de maltose e dextrinas e pela ação de enzimas fúngicas e ácidos a hidrólise é completa e são obtidos maltose e dextrose (ALMEIDA, 2010).

Uma das possíveis transformações do amido se dá pelo aquecimento de suspensões em excesso de água (>60 g/100g) causando uma transição irreversível denominada gelatinização. Este fenômeno dá-se quando o grânulo de amido intumescce com gradual hidratação devido ao relaxamento das ligações de hidrogênio mais fracas das áreas amorfas. Nestas condições, os grupamentos hidroxila (OH<sup>-</sup>) são liberados, ficando prontamente disponíveis para as ligações com as moléculas de água e em consequência disto ocorre à expansão dos grânulos de amido (MUCCILLO, 2009). Durante este estágio de aquecimento (30-95 °C), a modificação do amido ocorre por alteração de seu arranjo molecular e o transforma em gel de aparência opalescente, translúcida (ALMEIDA, 2010) e a viscosidade aumenta gradualmente até um valor máximo (ou pico de viscosidade) (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006). Sob este aquecimento máximo, à temperatura constante, as regiões amorfas são desestabilizadas, iniciando assim, o processo de gelatinização ou gomificação (Tabela 8).

Tabela 8. Temperaturas de gelatinização dos adjuntos mais utilizados na produção cervejeira (ANNEMULLER & MANGER, 2013).

Adjuntos	Nome Latino	Faixa de temperatura de gelatinização (°C), de acordo		
		[1]	[2]	[3]
Milho*	<i>Zea mays</i>	62-72	62-74	60-79
Arroz*	<i>Oryza sativa</i>	66-77	61-78	61-91
Cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	52-59	60-62	60-69
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	58-64	52-64	52-66
Centeio	<i>Secale cereale</i>	57-70	--	49-61
Sorgo	<i>Sorghum vulgare</i>	68-77	69-75	67-79

\* Need decoction

A gomificação despolimeriza o amido e a partir daí as moléculas de seus componentes tem condições de serem quebradas em moléculas menores e solúveis. A velocidade de transformação, a temperatura em que ocorre a viscosidade do produto são características de cada amido (ALMEIDA, 2010). Fisicamente, o inchaço do grânulo é observado através do aumento da viscosidade, ficando a dispersão do amido transparente, devido à maior incorporação de água, após certo período de tempo. A temperatura na qual a viscosidade começa a aumentar é chamada “temperatura de pasta”, parâmetro que pode ser obtido através de amilogramas provenientes de análises de viscosidade obtidas no viscoamilógrafo (RVA) (Figura 14).

A temperatura de pasta não deve ser confundida com a temperatura de gelatinização, que consiste da temperatura ou faixa de temperatura onde ocorre a perda de birrefringência, e onde acima da mesma, o processo de expansão é irreversível, devido à perda da estrutura cristalina. É considerada temperatura de gelatinização a faixa de temperatura na qual a perda de birrefringência é primeiramente

notada. Este gradiente de temperatura é influenciado pelas forças de ligação no grânulo, a qual varia de acordo com as espécies, isto é, composição do grânulo (razão amilose/amilopectina, conteúdo de fósforo, lipídios, enzimas e proteínas presentes), estrutura molecular da amilopectina (extensão da ramificação, massa molecular e arquitetura granular – razão entre regiões cristalinas e amorfas), morfologia do grânulo e distribuição de tamanhos dos grânulos de amido (MUCCILLO, 2009). A faixa de temperatura de gelatinização do amido é característica do genótipo da planta na qual o amido é sintetizado e é afetado pelas condições do meio (KLEIN, PINTO *ET AL.*, 2013). Como os grânulos da mesma fonte botânica não tem exatamente a mesma temperatura de gelatinização, em uma população de grânulos naturais a transição ocorre a um intervalo de 5 a 15 °C (MUCCILLO, 2009).

Com abaixamento da temperatura ou com eliminação da umidade a goma ou gel se torna turvo, opaco e ocorre formação de película ou de uma pasta rígida pela tendência de reversão cristalina, tendo assim a retrodegradação, às vezes desejável (ALMEIDA, 2010).

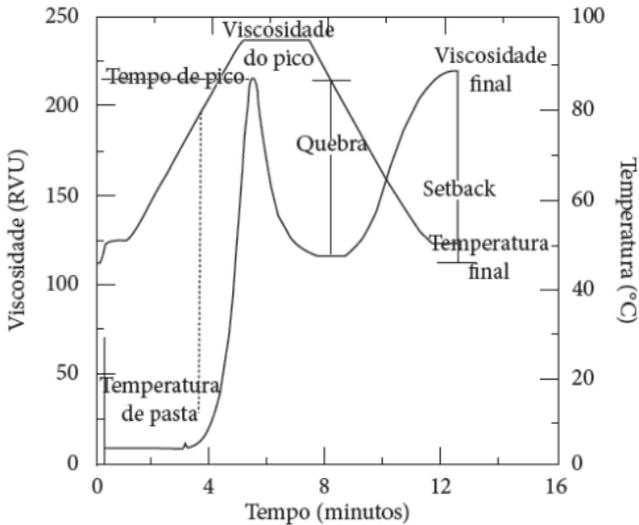


Figura 14. Perfil de uma viscoamilograma de amido (MUCCILLO, 2009).

A viscosidade do amido é tradicionalmente avaliada por meio de análises das curvas de viscosidade, denominadas viscoamilogramas, construído através de viscoamilógrafo (*Rapid Visco Analyses – RVA*)

com base na metodologia de (MAZURS, SCHOCH *ET AL.*, 1957). O perfil de empastamento de amidos obtidos através do RVA inclui pico de viscosidade, tempo para atingir este pico, quebra, viscosidade final, temperatura de pasta e *setback* ou índice de retrogradação que consiste na diferença entre a viscosidade final e a viscosidade mínima. Nesta análise, durante a fase inicial de aquecimento, um aumento na viscosidade é registrado no RVA quando os grânulos começam a inchar. A temperatura na qual a viscosidade começa a aumentar é denominada temperatura de pasta. Neste ponto, polímeros com menor massa molecular particularmente moléculas de amilose, começam a ser lixiviados dos grânulos. Um pico de viscosidade é obtido durante empastamento quando os grânulos em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também grânulos intactos e o alinhamento molecular dos polímeros solubilizados ainda não ocorreu dentro do campo de atrito do instrumento. Durante a fase de temperatura e agitação constantes, os grânulos começam a se quebrar, a solubilização dos polímeros continua e o alinhamento molecular ocorre dentro do campo de atrito do instrumento, resultando na diminuição da viscosidade. Ao ocorrer o resfriamento alguns polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar, formando um precipitado ou gel ocorrendo um aumento de opacidade da pasta. Este processo é conhecido como retrodegradação ou *setback* (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006), (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007).

Os viscoalimogramas obtidos por métodos viscoamilográficos rápidos refletem a característica do amido durante a formação do gel, bem como resistência do gel às forças mecânicas no aquecimento e a tendência a retrodegradação, mediante análise do comportamento no resfriamento. As curvas de viscosidade representam uma importante ferramenta para as observações do comportamento do gel com as condições de processamento da indústria, tais como aquecimento, agitação e resfriamento (CAPELLA, 2008). O amido da semente de pinhão mostra um perfil de viscoamilograma que não é usual de um cereal ou tubérculo, sendo mais próximo de um amido de leguminosa. O gel é altamente resistente ao calor e agitação mecânica e mostra uma relativa baixa retrogradação. Estudo realizado por (SPADA, 2011) apresenta os viscoamilogramas dos amidos nativos e modificados de milho e pinhão, sendo os valores de viscosidade máxima, viscosidade mínima, viscosidade final, quebra e *setback* (Figura 15).

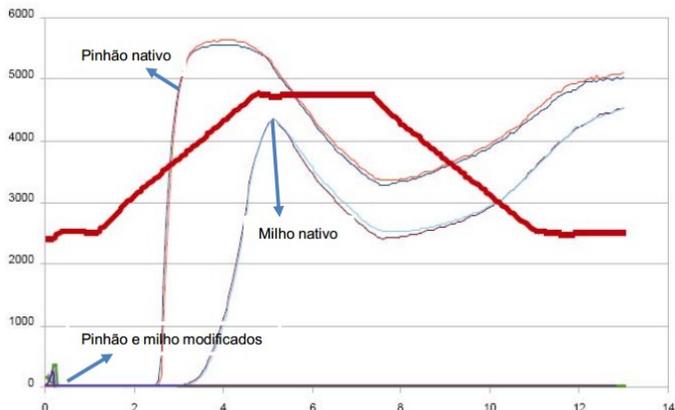


Figura 15. Eixo y (cP) e eixo x (tempo/min). Viscoamilogramas agregados dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho (SPADA, 2011).

O pinhão nativo tem baixa temperatura de pasta e pico de temperatura, com altos picos de viscosidade, *breakdown* (quebra) e viscosidade final quando comparado ao amido de milho (STAHL, LOBATO ET AL., 2007) (Tabela 9). A entalpia de gelatinização do amido do pinhão é baixa, indicando uma desorganização na estrutura molecular. Isto sugere que o comprimento da ligação e sua distribuição ao longo da molécula são diferentes, sendo atribuída assim à estrutura da amilopectina (CAPELLA, 2008).

Tabela 9. Propriedade de pasta dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho.

Amido	Temperatura de pasta (°C)	Viscosidade Máxima (cP)	Viscosidade Mínima (cP)	Viscosidade Final (cP)	Breakdown ou quebra (cP)	Setbak (cP)
Pinhão Nativo	68,0	5595,0	3320,0	5072,5	2275,0	1752,5
Milho Nativo	78,0	4347,0	2468,0	4534,5	1881,0	2067,5
Pinhão Modificado	0,0	10,0	0,0	1,5	12,0	1,0
Milho Modificado	0,0	57,0	14,0	18	46,0	2,5

Fonte: (SPADA, 2011), adaptado pelo autor.

Durante a rampa de aquecimento (30-95 °C), se observa o aumento da viscosidade devido ao inchamento dos grânulos de amido, levando a gelatinização. A temperatura na qual ocorre esse inchamento ou temperatura de pasta, o amido de pinhão nativo foi menor (68 °C) do que para o amido de milho (78 °C), indicando que o amido de pinhão apresenta menor resistência à dissociação das pontes de hidrogênio intramoleculares e maior facilidade de expansão do que o amido de milho (SPADA, 2011). Alguns autores obtiveram resultados próximos aos citados por (SPADA, 2011), já os resultados obtidos por (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006) foram semelhantes para a temperatura de gelatinização do amido de pinhão (63 °C) e para o amido de milho (73 °C), e quanto aos estudos feitos por (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007), semelhanças foram obtidas para o amido de pinhão, a

temperatura de gelatinização (59,6 °C) e para o amido de milho a temperatura de gelatinização de (74,8 °C). Estudos realizados por (KLEIN, PINTO *ET AL.*, 2013), obtiveram a temperatura de gelatinização do amido de pinhão (64,6 °C).

As variações dos valores obtidos se deve a metodologia de extração empregada, o cultivar e as condições experimentais influenciando nas respostas. A viscosidade de pasta é importante na avaliação da qualidade do amido, uma vez que a fluidez pode interferir nos equipamentos a serem utilizados e dimensionados em uma linha de produção, até no produto a ser fabricado. Neste contexto, pode-se dizer que o amido do pinhão é uma importante alternativa para o desenvolvimento de produtos que requerem alta viscosidade, sob temperaturas relativamente menores em comparação ao milho (WOSIACKI & CEREDA, 1985).

Para o todo o processo de produção cervejeira, sendo o adjunto de fonte amilácea, deve-se analisar a temperatura de gelatinização deste amido. Se essa temperatura de gelatinização é próxima à temperatura de ativação das enzimas do malte, então este não precisará ser pré-cozido ou sendo necessária uma tina de cozimento extra (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Em relação ao amido de milho, o pinhão possui uma faixa de temperatura mais baixa, podendo assim, ter uma considerável economia de energia.

#### 2.2.5. Leveduras

As leveduras são microrganismos utilizados na produção de uma gama de produtos alimentícios, em especial bebidas fermentadas. São microrganismos eucarióticos predominantemente unicelulares e pertencentes ao reino Fungi. Como os bolores, são fungos, mas deles se diferenciam por se apresentarem em forma unicelular. Sua reprodução vegetativa se faz geralmente por gemulação ou brotamento. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; PRIEST & STEWART, 2006; CARVALHO, 2009).

A levedura realiza fermentação do açúcar com o objetivo de gerar energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol somente um subproduto desse processo. O gênero *Saccharomyces* apresenta várias linhagens consideradas seguras e capazes de produzir dois metabolitos primários importantes, etanol e dióxido de carbono. Os tipos de cervejas mais importantes (*Ale* e *Lager*) são fermentados com linhagens de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, respectivamente

(VENTURINI, 2010; WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Antigamente esta última era chamada de *S. uvarum* ou *S. carlsbergensis*. As leveduras cervejeiras se diferenciam na dinâmica do processo fermentativo sendo que as do tipo *Ale*, fermentam no topo do fermentador e as do tipo *Lager*, fermentam no fundo do fermentador. As leveduras *Ale*, fermentam em temperaturas mais altas que as *Lager*, na faixa de (18-25 °C), e após processo fermentativo decantam para o fundo do fermentador. As leveduras *Lager*, fermentam em temperaturas mais baixas na faixa de (8-12 °C), e após processo de fermentação se estabelecem no fundo do fermentador. Leveduras do tipo *Lager*, diferem bioquimicamente das *Ale*, por possuírem a enzima alfa-galactosidase e fermentam o carboidrato melibiose. Além disso, as leveduras lagers passaram a ser mais populares devido ao resfriamento do processo e também ao trabalho de microbiologistas como Cristian Hansen, em isolar e utilização de culturas puras para fabricação de cervejas. Conseguiu-se então neste primeiro momento "domesticar" as cepas Lagers, já que as cepas Ales trabalhava-se à temperaturas mais altas, sendo bastante contaminadas por leveduras selvagens (LEA & PIGGOTT, 2003; BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; PRIEST & STEWART, 2006; VENTURINI, 2010; WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

A levedura *Saccharomyces* é um aeróbio facultativo, tem a habilidade em se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais de metabolismo dos açúcares irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, gás carbônico e água em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e gás carbônico em anaerobiose, processo denominado fermentação alcoólica (BRANDÃO, CARVALHO *ET AL.*, 2007).

A bioquímica das reações que ocorrem durante a fermentação representa a acumulação de efeitos de crescimento das leveduras no meio nutritivo, que no meio cervejeiro é denominado de mosto. Um mosto típico de cerveja tipo Pilsen, com alta gravidade específica de 1.060 (15 °P) contém aproximadamente 150 g/L de açúcares fermentáveis e 150 mg/L de aminoácidos livres (FAN) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). O desaparecimento de nutrientes e a formação de etanol, CO<sub>2</sub> e outros metabólitos, que conjuntamente contribuem para a formação da cerveja, são todos sub-produtos das leveduras em crescimento. O mosto cervejeiro é um meio complexo e ainda não completamente caracterizado. Açúcares, dextrinas, aminoácidos,

peptídeos, proteínas, vitaminas, íons, ácidos nucleicos e muitos outros constituintes (PRIEST & STEWART, 2006). Similarmente, as reações que ocorrem durante a fermentação também ainda não são bem caracterizadas. A bioquímica da *S. cerevisiae* ainda é motivo de intensivo estudo. Leveduras cervejeiras são heterótrofos, anaeróbicos facultativos. Elas podem oxidar um vasto espectro de moléculas orgânicas tanto para geração de energia em forma de ATP, quanto obter esqueletos de carbono para reações anabólicas (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

A concentração celular de carboidratos nas células de leveduras é de aproximadamente 30-35 % (massa seca) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). A concentração inicial de carboidratos fermentáveis controla a síntese de etanol durante o processo fermentativo. O espectro de carboidratos fermentados e a máxima concentração de etanol tolerado são determinadas pela genética de cada cepa de levedura (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Para a produção de cerveja, as fontes de carboidratos utilizados pelas leveduras estão listadas abaixo: monossacarídeos (glicose, frutose, manose, galactose), dissacarídeos (maltose, sacarose) e trissacarídeos (rafinose, maltotriose). Os fatores que influenciam o desempenho das leveduras, assim como a individualidade ou a combinação entre performance e individualidade, para absorção dos açúcares presentes no mosto são:

- ✓ A linhagem de levedura;
- ✓ A concentração e os tipos de nitrogênio assimilados;
- ✓ A concentração de íons;
- ✓ A temperatura de fermentação;
- ✓ A taxa de inóculo;
- ✓ A tolerância das leveduras ao etanol;
- ✓ A gravidade específica do mosto;
- ✓ A taxa de oxigenação com a taxa de inóculo;
- ✓ O espectro de açúcares do mosto.

A ordem de absorção dos açúcares pela levedura segue aproximadamente a seguinte ordem: glicose>frutose>sacarose>maltose>maltotriose (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

O crescimento pode ser oxidativo e/ou fermentativo, dependendo da levedura e do meio de manipulação (com ou sem O<sub>2</sub>). Parte desses açúcares não fermentados pode ser armazenada pelas células de leveduras na forma de glicogênio e trealose. Este armazenamento de energia química será utilizado quando o meio na qual a levedura se encontra estiver com depleção de açúcares (KUNZE, 1999). Também é

muito importante para as leveduras reterem energia sob outras formas e não simplesmente na forma de armazenamento de calor. As formas mais importantes de energia química de reserva são: Adenosina di-fosfato (ADP) e Adenosina tris-fosfato (ATP). O ATP é importante fonte de energia servindo tanto como energia de reserva da levedura como energia de transferência de elétrons, sendo essencial para o processo de fermentação alcoólica, assim como para os demais processos metabólicos da levedura (KUNZE, 1999).

O metabolismo de transporte de açúcares é ajustado por processos enzimáticos, (Figura 16), pela membrana celular da levedura e pela ação de sistemas de transporte específicos, dada à baixa permeabilidade. A glicose e a frutose são reconhecidas pela levedura através de difusão facilitada, cessando este transporte quando as concentrações são iguais dentro e fora da célula. A maltose e a maltotriose são admitidas por um mecanismo de transporte ativo e suas concentrações na célula podem fazer com que haja maiores concentrações dentro da célula do que fora. O consumo de sacarose é controlado pela enzima extracelular invertase, excretada pela levedura. Esta enzima hidrolisa a sacarose em glicose e frutose que são reconhecidas pela levedura por mecanismos já citados. A maltose no interior da célula é hidrolisada pela enzima  $\alpha$ -glucosidase. A maltotriose é transportada semelhante à maltose e provavelmente, pela sua própria permease, mas a uma velocidade inferior (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; CARVALHO, 2009). A utilização da maltose e maltotriose são inibidas pela adição de glicose (PRIEST & STEWART, 2006). Uma vez no interior da célula, os açúcares são metabolizados pela via glicolítica, originando etanol e CO<sub>2</sub>.

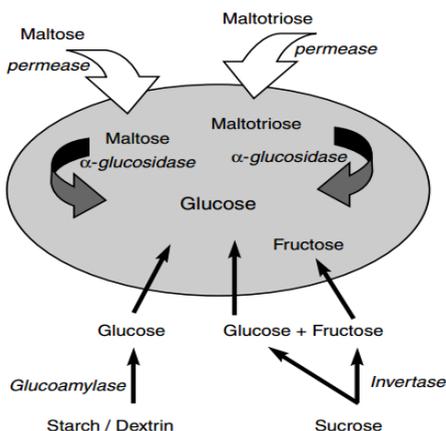


Figura 16. Consumo de carboidratos e enzimas ativas, pela *Saccharomyces ssp* (PRIEST & STEWART, 2006).

A concentração de proteína nas células de leveduras é de aproximadamente 40-45 % (massa seca) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). O crescimento de leveduras ativas envolve o consumo, principalmente de nitrogênio na forma de aminoácidos para síntese de proteínas e outros compostos de nitrogênio para a formação celular (KUNZE, 1999; PRIEST & STEWART, 2006). No processo fermentativo a multiplicação celular é cessada, quando termina o consumo de nitrogênio. No mosto, a principal fonte de nitrogênio é para síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. Essa composição é originada durante a proteólise do malte (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). O mosto cervejeiro contém 19 aminoácidos e assim como existe uma ordem na assimilação dos açúcares também existe uma ordenação no consumo dos aminoácidos. Quatro grupos de aminoácidos foram identificados com base em sua assimilação, como listado no Quadro 4.

Quadro 4. Ordem de assimilação dos aminoácidos pela levedura.

A- Absorção rápida	B- Absorção intermediária	C- Absorção lenta	D- Absorção pequena ou sem absorção
Acido glutâmico	Valina	Glicina	Prolina
Acido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Iso-leucina	Triptofano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amônia	
Lisina			
Arginina			

Fonte: (STEWART & RUSSELL, 1998)

Os aminoácidos do grupo A são utilizados imediatamente quando as leveduras são inoculadas, enquanto os aminoácidos do grupo B são assimilados mais devagar. A utilização dos aminoácidos do grupo C se inicia quando termina o consumo do grupo A. O aminoácido Prolina é muito pouco utilizado pelas leveduras (STEWART & RUSSELL, 1998). O metabolismo de assimilação dos aminoácidos é dependente da fase em que se processa a fermentação e pela quantidade de aminoácidos no mosto cervejeiro. O nível de nitrogênio no mosto afeta a fermentação quando em níveis inferiores a 100 mg/L de aminoácidos. Os aminoácidos não são habitualmente incorporados diretamente pelas células de leveduras, sofrendo reações de transaminação. Significantes porções de esqueletos de aminoácidos das proteínas de leveduras são derivados via catabolismo de carboidratos do mosto. Isto explica porque o total de aminoácidos do mosto é importante para determinar a taxa de crescimento fermentativo. O espectro de aminoácidos no mosto influencia também o perfil aromático (*flavour*) da cerveja (STEWART & RUSSELL, 1998; PRIEST & STEWART, 2006).

As leveduras requerem alguns íons inorgânicos para otimizar seu crescimento e processo fermentativo. Concentrações apropriadas de alguns elementos permitem um crescimento acelerado e um aumento no rendimento de biomassa e produção de etanol (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Um desbalanço nos íons causa alterações no metabolismo e crescimento das leveduras. Os íons inorgânicos são requeridos para processos enzimáticos e estruturais. As Funções enzimáticas compreendem: i) Ativadores enzimáticos ( $Mg^{2+}$ ), influenciando em reações fosforilativas, particularmente durante a fermentação, sendo cofator de carboxilases/descarboxilases; ii) Metalos coenzimas ( $K^+$ ), atuando como cofator nas reações conectadas com ATP, tendo importância no metabolismo de energia e permeabilidade da membrana (transporte ativo); iii) Cofatores redox de pigmentos ( $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ ); iv) Catalisadores nos processos enzimáticos ( $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ). Nas funções estruturais envolvem a neutralização de forças eletrostáticas presentes na estrutura celular de várias moléculas aniônicas, como: a) Íons  $K^+$  e  $Mg^{2+}$ , se ligam ao DNA, RNA, proteínas e polifosfatos; b) Íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  se ligam aos fosfolípidios da membrana celular eletricamente negativa; c) Íons  $Ca^{2+}$  se complexam com os fosfatos da parede celular (PRIEST & STEWART, 2006).

A habilidade de um microrganismo de crescer e sintetizar um produto em um dado ambiente é determinado pelas características genéticas desse organismo. Sendo assim, o desenvolvimento bem sucedido de um processo fermentativo depende primeiramente da

obtenção de uma boa cepa por seleção, e segundo, elucidar o efeito dos parâmetros ambientais de crescimento e formação de produtos, tais como pH, temperatura, oxigenação, concentração de açúcares e álcool (REIS, 2011). A fermentação alcoólica é definida como um processo que não envolve a fosforilação oxidativa, onde ocorre a transformação de açúcares em etanol e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) com a regeneração de  $\text{NAD}^+$ . As leveduras utilizam os açúcares como fonte de energia para suas atividades fisiológicas, para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol e o  $\text{CO}_2$  expelidos da célula como subprodutos. O dióxido de carbono se dissipa no ar e o etanol permanece na fase líquida.

A transformação de uma molécula de glicose em duas de ácido pirúvico, acontece sob ação da enzima piruvato descarboxilase que são convertidas em acetaldeído com liberação de  $\text{CO}_2$ . Após a ação da enzima álcool desidrogenase há conversão do acetaldeído em etanol com a reposição de  $\text{NAD}^+$ , indispensável para a continuação do processo. A Figura 17 descreve a via de fermentação alcoólica onde o processo inicial da glicólise ocorre (VALLE, 2012).

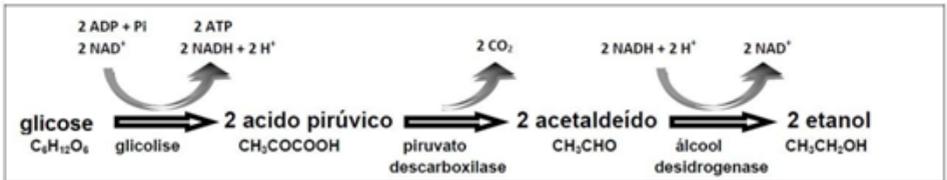


Figura 17. Via de fermentação alcoólica, adaptado pelo autor (VALLE, 2012).

A fermentação produz outros metabólitos além do etanol e dióxido de carbono. São importantes apesar de aparecerem em pequena quantidade, sendo responsáveis pelo aroma da cerveja. Dessa forma podem influenciar as propriedades organolépticas das bebidas alcoólicas produzidas. Estes compostos são os alcoóis superiores (álcool isoamílico, n-propanol, 2-feniletanol, entre outros), aldeídos, ésteres, acetatos e o glicerol (VALLE, 2012). As Leveduras são um dos mais importantes contribuintes para o desenvolvimento de aroma para a cerveja. As características de sabor e aroma estão determinadas de forma preponderante pela linhagem de levedura utilizada. Embora o etanol seja o principal produto de excreção produzido pela levedura durante a fermentação do mosto, esse álcool primário tem pequeno impacto no sabor da cerveja. O tipo e a concentração de vários produtos de excreção formados durante a fermentação é o que primariamente

determina o sabor da cerveja. A formação desses compostos aromáticos depende de todo o processo metabólico da levedura (RONALDO, 2009; VENTURINI, 2010). Vários fatores podem afetar esse processo metabólico e, conseqüentemente, o sabor da cerveja, incluindo **i**) linhagem de levedura; **ii**) temperatura e o pH da fermentação, o tipo e a proporção de adjunto, o modelo do fermentador; **iii**) concentração do mosto (gravidade inicial, OG); **iv**) quantidade de inóculo; **v**) oxigenação inicial da fase *lag* (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

Importante para o processo de otimização da fermentação, está em conhecer o perfil da linhagem de levedura a ser utilizada. Os microrganismos agem segundo seu sistema enzimático, o qual como se sabe, é constituído por milhares de enzimas. Estas enzimas são sintetizadas pelo próprio microrganismo, porém esta síntese é controlada pelas condições do meio externo (fenômenos de indução e repressão), assim como a ação das enzimas é também modulado (presença de inibidores e ativadores), o que confere ao sistema uma enorme complexidade. Um dos parâmetros para se caracterizar o perfil fermentativo de cada cepa, é obter uma máxima produtividade com qualidade constante do produto.

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade das leveduras, influenciando no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular (REIS, 2011). A influência da temperatura nas fermentações de mostos com alta concentração inicial de substrato está relacionada à tolerância ao etanol. Mosto com alta concentração, por exemplo (27 °P), obtidos com adição de xarope de milho, suplementados com nutrientes e fermentados à 14, 20, 25 e 30 °C mostraram que a velocidade de fermentação acompanhou o aumento da temperatura. Por outro lado, a medida da viabilidade celular após o quinto dia, apresentou resultados extremamente baixos em mosto fermentados em altas temperaturas, apesar dos níveis de etanol terem sido similares ao final das fermentações. A explicação para o aumento do efeito inibitório do etanol em altas temperaturas tem sido atribuída ao acúmulo de etanol intracelular (VENTURINI, 2010). A alta temperatura de fermentação e alta concentração de aminoácidos favorecem a formação de álcoois superiores em cervejas (LEA & PIGGOTT, 2003).

O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa do meio leva a redução de crescimento e perda da viabilidade das células de leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o interior e o exterior de suas células (REIS, 2011). A composição

do meio com elevados teores de substratos acaba por exercer grande influência sobre a capacidade fermentativa da levedura, conduzindo a fermentações mais lentas. As leveduras cervejeiras são geralmente caracterizadas por possuírem uma tolerância relativamente baixa as altas concentrações de etanol. O crescimento celular é inibido em concentrações acima de 15 % (v/v), enquanto a capacidade fermentativa é inibida em concentrações acima de 17 % (v/v) de etanol. A tolerância ao estresse das leveduras cervejeiras durante fermentação de mostos com alta densidade depende da cepa utilizada (VENTURINI, 2010).

Logo, a suplementação do meio com extrato de levedura como fonte de nitrogênio, peptona, uma mistura de ergosterol e ácidos graxo insaturado (por meio da fração de ácido oleico do Tween 80), e sais de magnésio ou potássio apresenta efeito positivo sobre a velocidade de fermentação global e mesma produção de etanol em tempos menores (VENTURINI, 2010). A concentração de nutrientes limitantes do crescimento em mostos de alta densidade deve ser aumentada em proporção à concentração específica do mosto utilizado.

Segundo Venturini Filho e Cereda (2001), no início da fermentação alcoólica a quantidade de leveduras a ser utilizada deve ser tal que resulte numa concentração de 5 a 15 milhões de células de levedura por ml de mosto. Embora as circunstâncias variem de mostos para mostos e de linhagens para linhagens, uma fermentação requererá 1 ppm de oxigênio dissolvido e  $0,75-1 \times 10^6$  UFC/mL para cada 1 °P de extrato no mosto para leveduras do tipo Ale, e o dobro para leveduras do tipo Lager (ESSLINGER & NARZISS, 2003; VENTURINI, 2010). Porém, pra fermentações de mostos de alta densidade, por exemplo, 25 °P, a taxa de inoculo fica em torno de  $1,5-3,5 \times 10^7$  UFC/ml, gerando uma maior velocidade de fermentação do mosto e uma diminuição do tempo da atenuação limite do mosto (VENTURINI, 2010).

Quanto à utilização de oxigênio, as leveduras *S. cerevisiae* tem características facultativas, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência (fermentação) como na presença de oxigênio (respiração) (REIS, 2011). A fermentação do mosto para a produção de cerveja é principalmente anaeróbica, mas no momento de inoculação com a levedura, certa quantidade de oxigênio deve estar disponível para favorecer a multiplicação celular. Somente no início do processo fermentativo o oxigênio é benéfico; em qualquer outra etapa, promove oxidações e instabilidade no produto final (VENTURINI, 2010).

Se o processo fermentativo já estiver iniciado e ocorrer incremento de grandes quantidades de oxigênio, a fermentação alcoólica é inibida, fenômeno denominado efeito Pasteur. Este efeito está

associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento (fase estacionária) na qual ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose (REIS, 2011).

As leveduras requerem oxigênio para sintetizarem ácidos graxos insaturados e esteróis, os quais são necessários para o metabolismo anaeróbico (VENTURINI, 2010), sendo estes compostos essenciais para as membranas e pré-requisito para o crescimento celular (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Durante todo o processo fermentativo ocorre o decréscimo de ácidos graxos insaturados e esteróis, fazendo com que limite a taxa de crescimento celular, portanto a oxigenação para uma nova reutilização destas leveduras (reinoculação) é essencial para a formação e estruturação das membranas celulares (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Contudo, em altas concentrações de açúcares ocorre a inibição da atividade das enzimas respiratórias, levando a produção de álcool na presença de oxigênio, processo denominado Efeito Crabtree (REIS, 2011).

Fermentações aeróbicas, ou seja, com disponibilidade de oxigênio, produz um espectro diferente de ésteres comparado as fermentações anaeróbicas. Geralmente, mais ésteres são produzidos quando a fermentação é totalmente anaeróbica. Por exemplo, o etil hexanoato, etil-octanoato (aromas de frutas), e fenil-etil acetato (aroma de mel, rosas), são encontrados em fermentações anaeróbicas. Enquanto, em fermentações aeróbicas, a produção de ácido acético e acetaldeído, são os componentes predominantes (LEA & PIGGOTT, 2003).

### 2.3. Contaminantes da Cerveja

Contaminantes podem estar presentes na cerveja, devido à matéria-prima, ambiente da cervejaria e manipulação (VENTURINI, 2011). Ao longo dos séculos produzir cervejas de excelente qualidade tem sido o desafio enfrentado por cervejeiros de todo o mundo. Considerada por muitos como uma bebida viva e, especialmente por sua qualidade estar intimamente ligada ao processo de fermentação do qual resulta, a principal atribuição do cervejeiro, está em criar as condições perfeitas e garantir que as leveduras possam desempenhar adequadamente o seu papel (RODOLFO, 2015).

Disponibilizar nutrientes necessários, proporcionar a temperatura ideal, manter a viabilidade e a pureza das cepas de leveduras empregadas são alguns dos fatores primordiais para o sucesso da

elaboração de uma cerveja. Infelizmente ao promover o ambiente favorável para a multiplicação das leveduras, outros microrganismos indesejados terminam por ingressar no processo, impactando negativamente no resultado deste. Manter microrganismos contaminantes em níveis adequados no processo cervejeiro tem demandado esforços consideráveis por parte das indústrias, exigindo uma rigorosa rotina de controles ao longo de todo o processo de elaboração bem como nas matérias-primas nele empregadas. As condições gerais do ambiente produtivo, dos manipuladores e dos processos de higienização necessitam ser adequadamente controlados, garantindo assim a qualidade esperada para o produto final (RODOLFO, 2015).

É de extrema importância que os parâmetros de qualidade da cerveja fiquem constante ao longo de todo o processo. O monitoramento do processo e o controle de qualidade sensorial, assim como estabilidade de espuma e turbidez são necessários para uma boa reprodutibilidade da bebida (KUNZE, 1999). Os fatores de sensibilidade microbiológica da cerveja, suas características intrínsecas, peculiares do processo de elaboração e controles necessários para que se possa conferir a proteção necessária à bebida frente aos contaminantes são (RODOLFO, 2015):

- A baixa disponibilidade de oxigênio, gerada pela presença de CO<sub>2</sub>, aliada a baixos valores de pH constituem importantes fatores de inativação microbiana na cerveja, os quais somados ao poder bacteriostático exercido por constituintes presentes na bebida, como o lúpulo e álcool, complementam a sua estabilidade microbiológica.
- Nutricionalmente, a cerveja pode ser considerada um meio deficiente para uma grande parte dos microrganismos, uma vez durante a etapa de fermentação, as fontes de carbono e nitrogênio são praticamente exauridas pelas leveduras. Por outro lado, substâncias provenientes do metabolismo intermediário das leveduras e outras excretadas durante a autólise das células podem ser utilizadas como fonte de nutrientes e metabolizadas por eventuais microrganismos deteriorantes.
- As matérias-primas empregadas na elaboração do mosto (malte, água, adjuntos, etc), trazem consigo uma extensa biota microbiana a qual, nas etapas iniciais da elaboração (maceração e fervura), será significativamente reduzida pelo uso do calor requerido por esses processos. Os microrganismos capazes de resistir ao processo térmico (esporulados principalmente) não

devem constituir um grande perigo, uma vez que a rápida queda no valor de pH e as temperaturas reduzidas durante a fase de fermentação impedirão o seu crescimento.

- Atenção especial deve ser dada as etapas frias de processo, nos processos pós fervura, onde pela ausência de calor, qualquer microrganismo contaminante que venha ingressar no processo, encontrará ambiente bastante favorável para sua proliferação; portanto qualquer matéria-prima que possa ser adicionada posteriormente e até mesmo o oxigênio ou ar empregados na etapa de aeração, podem constituir uma agente contaminante importante.
- Um rápido resfriamento do mosto aliado a excelentes condições de sanidade dos equipamentos (resfriados, tubulações, tanques, etc) são maneiras de impedir uma contaminação do mosto terminado.
- Durante a fase inicial do processo de fermentação, a vitalidade das células de leveduras e sua capacidade de multiplicação influenciarão diretamente no sucesso de sua competição contra outros microrganismos naturalmente presentes no ambiente da fermentação. A temperatura correta aliada ao correto grau de aeração do mosto auxiliarão de maneira decisiva no sucesso da etapa de fermentação.

Apesar das restrições proporcionadas pela sua composição e pelos processos empregados em sua fabricação, um grupo de microrganismos em especial possui a capacidade de sobreviver e se multiplicar na cerveja. Embora a cerveja seja restritiva ao crescimento bacteriano devido as suas características (pH baixo, concentração de álcool, baixo teor de oxigênio), as cervejarias não são exceção a essa regra. Identificar, controlar e eliminar esses microrganismos tem sido, nos últimos anos, uma dos maiores desafios enfrentados pelas cervejarias (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; PRIEST & STEWART, 2006). A presença desses microrganismos no processo tem uma série de consequências negativas, como:

- Interferência e redução da eficiência de fermentação;
- Alteração e comprometimento da qualidade sensorial;
- Acidificação, turbidez, sedimentação e má formação de espuma;
- Redução do tempo de prateleira do produto;
- Rejeições e devoluções de lotes do mercado, etc.

Esses microrganismos fazem parte da microbiota natural do ambiente cervejeiro, sendo encontrados nas matérias-primas, na água, em equipamentos inadequadamente higienizados ou mal dimensionados e também no ambiente (ar). O risco de deterioração bacteriana é a principal preocupação das indústrias de bebidas e alimentos voltadas para a qualidade, pois gera grandes perdas econômicas e impacta negativamente a imagem da marca. Bactérias são agentes danificadores comuns da cerveja. São comumente divididas nas categorias Gram-positivas e Gram-negativas (VENTURINI, 2010; RODOLFO, 2015). As bactérias Gram-positivas, são as que trazem os maiores problemas para a cerveja, são as bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

Os *Lactobacillus* cervejeiros são heterofermentativos e homofermentativos, alterando seu sabor causando *off-taste*, produzindo ácido láctico e acético, CO<sub>2</sub>, etanol e glicerol como produtos finais, com algumas espécies também produzindo diacetil e pentanodiona (LEA & PIGGOTT, 2003).

Por outro lado, a presença de *Lactobacillus* pode ser proposital para que se confira uma diferenciação sensorial à bebida. Cervejas do tipo Berliner Weiss é exemplo desse uso. Os *Pediococcus* são homofermentativos e possuem seis espécies identificadas, mas a espécie predominante encontrada na cerveja é *Pediococcus damnosus* sendo sua infecção caracterizada pela formação de ácido láctico, diacetil e pentanodiona (LEA & PIGGOTT, 2003). Entre as bactérias Gram-negativas que causam danos a cerveja incluem-se as bactérias acéticas (*Acetobacter* e *Gluconobacter*), e alguns membros da família das enterobactérias (*Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Obesumbacterium*) como também *Zymomonas*, *Pectinatus* e *Megasphaera* (VENTURINI, 2010).

A presença de leveduras selvagens também é potencial fonte de contaminação. Levedura selvagem é qualquer levedura diferente da levedura de cultivo utilizada na elaboração da cerveja. Elas podem ser originadas de diferentes fontes. Estudos encontraram mais de 120 leveduras selvagens isoladas a partir de mosto e cerveja, demonstraram que, além de várias espécies de *Saccharomyces*, foram encontradas espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (KUHLE & JESPERSEN, 1998; VENTURINI, 2010).

Os efeitos potencialmente causados pela contaminação por levedura selvagem variam de acordo com cada contaminante. Se o

contaminante é outra levedura cervejeira, os principais problemas estão relacionados com a velocidade de fermentação, atenuação final, floculação e paladar do produto final. Se o contaminante não é uma levedura cervejeira, este pode competir pelos constituintes do mosto, possivelmente ocorrendo problemas como produção de *off-flavours* semelhantes àqueles produzidos pelas bactérias (VENTURINI, 2010). Modernamente, os microrganismos contaminantes vêm sendo estudados e classificados conforme seu potencial de deterioração e risco de infecção no decorrer do processo, dividindo-se em quatro importantes grupos conforme demonstrado na Quadro 5.

Quadro 5. Importância dos microrganismos contaminantes de acordo com seus potenciais de deterioração da cerveja.

I-	<p>Obrigatórios (Potencial forte de deterioração)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta tolerância às características da cerveja;</li> <li>• Curto tempo de adaptação;</li> <li>• Causam turbidez e sedimentação;</li> <li>• Produção de diversos metabólitos indesejáveis na cerveja.</li> </ul> <p>Exemplos:</p> <p><i>Lactobacillus brevis</i>, <i>L. Lindneri</i>, <i>Pediococcus damnosus</i>, <i>Megasphaera cerevisiae</i>, <i>Pectinatus cerevisiophilus/frisingensis</i>, <i>Saccharomyces diastaticus</i>.</p>
II-	<p>Potenciais (Potencial médio de deterioração)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crescem apenas em condições específicas, como: baixo álcool, baixo lúpulo, pH elevados, alto oxigênio, má atenuação;</li> <li>• Longos tempos de adaptação;</li> <li>• Causam turbidez e sedimentação.</li> </ul> <p>Exemplos:</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactococcus lactis</i>, <i>Micrococcus kristinae</i>, <i>Zymomonas mobilis</i>, <i>Saccharomyces pastorianus</i>.</p>
III-	<p>Indiretos (Potencial médio de deterioração)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem crescimento na cerveja;</li> <li>• Crescem no mosto e no início da fermentação;</li> <li>• Causam deterioração Fenólica, DMS, Acetoína e problemas na fermentação.</li> </ul> <p>Exemplos:</p> <p>Bactérias: <i>Enterobacter agglomeran</i>, <i>Enterobacter cloacae</i>, <i>Serratia marcescens</i>, <i>Obesumbacterium proteus</i>.</p> <p>Leveduras: <i>Candida kefir</i>, <i>Pichia anomala</i>, leveduras selvagens.</p>

IV-	<p>Indicadores (Potencial fraco de deterioração)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não causam deterioração, mas indicam higiene deficiente;</li> <li>• Falhas no processo de limpeza e sanitização;</li> <li>• Estão associados geralmente aos deteriorantes;</li> <li>• Podem ser identificados por meio de uma rotina de controle com swabs.</li> </ul> <p>Exemplos:</p> <p><i>Acetobacter pasteurianus, acinetobacter calcoaceticus, Klebsiella pneumoniae, debaryomyces hansenii, Saccharomyces selvagens.</i></p>
-----	---

**Fonte:** (RODOLFO, 2015)

#### 2.4. Processo de Fabricação da Cerveja

O processo milenar de fermentação de um mosto obtido a partir do cozimento de cereais para a obtenção da cerveja vem sendo aprimorado ao longo do tempo. A cerveja que conhecemos hoje é resultante de um processo que vai muito além da simples transformação de moléculas de açúcar em etanol e CO<sub>2</sub> (RONALDO, 2009).

Cerveja é descrito como uma bebida que contém álcool, extrato e gás carbônico. Cerveja é preparada a partir de cevada maltada, lúpulos, água e leveduras. O álcool deve ser exclusivamente produzido a partir destes ingredientes, que foram convertidos em açúcares fermentáveis durante o processo de brassagem.

A cevada maltada pode ser combinada com trigo maltado e outros adjuntos cereais não maltados. As leis de uso e proporção de uso de adjuntos variam de país a país. Durante este processo, chamado brassagem, moléculas de alta massa molecular do malte são degradadas por certas enzimas específicas, que são ativadas em certas faixas de temperaturas. A suspensão é filtrada para separar a parte líquida, chamada mosto, da parte sólida, ou bagaço. Este processo é chamado de filtragem. O mosto é então fervido com adição de lúpulos, causando coagulação dos constituintes, chamado de *trub* quente. Este precipitado é removido e o mosto então clarificado é resfriado até a temperatura de inoculação. Esta temperatura varia conforme o tipo de levedura e o tipo de cerveja que irá produzir. O processo de fermentação é iniciado após inoculação das leveduras e saturação do mosto com oxigênio. Os açúcares fermentáveis de baixa massa molecular do mosto são convertidos em etanol e numerosos compostos de aromas (produtos de

fermentação), de acordo com o metabolismo da cepa de levedura utilizada. Após o processo de maturação, o sabor é enriquecido com gás carbônico produzido pela fermentação. A cerveja passa por um processo de filtração e então engarrafada (ESSLINGER & NARZISS, 2005).

#### 2.4.1. Produção do mosto cervejeiro

O processo de produção do mosto cervejeiro ou *mashing*, é a mistura de cereais maltados moídos e adjuntos, com água quente, essa mistura então homogeneizada e deixada em repouso em certas temperaturas, na qual haverá ativação enzimática degradando beta-glucanos, proteínas e amidos presentes na solução, resultando em açúcares que compreenderão a solução, o mosto (PRIEST & STEWART, 2006). Existem 3 principais métodos de *mashing* que tem sido usado pelos cervejeiros, cada uma dependente dos equipamentos e materiais envolvidos:

i) *Mashing* por infusão: Este é um método clássico Britânico, na qual é usado uma tina de mostura a temperatura constante e sem agitação (LEA & PIGGOTT, 2003). Este processo também é adaptado para fazer múltiplas rampas de temperatura com agitação, onde se deseja diferenciar por diferentes temperaturas empregadas cada qual ativando uma enzima específica, desta forma podemos personalizar a cerveja e o perfil fermentativo do mosto. Para este tipo de equipamento é requerido para um tipo de cereal maltado de alta qualidade, bem modificado, sendo utilizado por pequenas cervejarias. A separação do mosto do bagaço se faz na panela de filtragem (*mash tun*) (BRIGGS, BOULTON ET AL., 2004) (Figura 18).

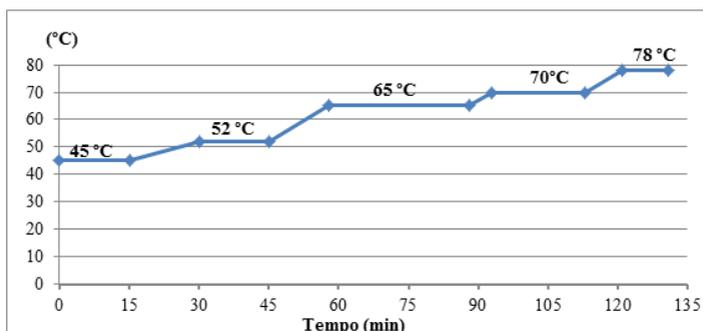


Figura 18. Rampas de mosturação em função da temperatura com várias rampas de temperatura (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

ii) *Mashing* por decocção: Este método é um clássico Europeu, na qual usa-se uma série de diferentes temperaturas, o equipamento cervejeiro é mais sofisticado podendo se trabalhar com cereais maltados menos nobres ou menos germinados. O aumento da temperatura é iniciado pela decocção propriamente dita, parte do malte (*mash*) é levado à fervura que após algum tempo é retornado a tina de mostura principal. Este processo pode ser uma, duas ou até 3 vezes (Figura 19). Desta maneira, se obtém temperaturas ótimas de proteólises (40 a 50 °C), seguido por temperaturas ótimas na hidrólise do amido (65 °C) e finalmente chegando em temperatura de separação do bagaço (76 °C). Neste caso também é necessário o uso da tina de filtração (separação do bagaço do mosto) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

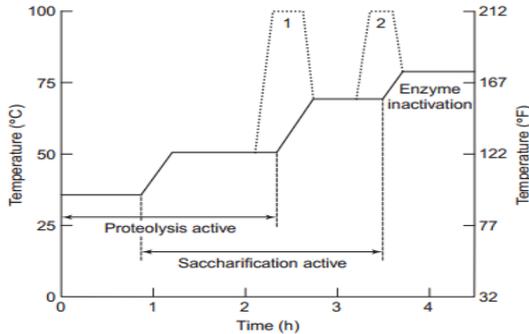


Figura 19. Rampas de mosturação em função da temperatura típico de dupla-decocção (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

iii) *Mashing* duplo: Este método é um clássico Americano. Este processo é usado quando se utiliza adjuntos que precisam ser pré-cozinhados (gelatinizado), antes da adição dos cereais maltados. São necessários duas tinas, a tina de mostura e a tina de gelatinização. Após a completa gelatinização do adjunto, então os dois são misturados no cozinhador. Adjuntos como arroz, milho, maisena, etc, são aquecidos com água em temperatura de aproximadamente (85 °C), deixando por 10 minutos para alcançar a viscosidade desejada. Neste processo parte do malte, 5 a 10 %, é adicionado para ajudar na redução da viscosidade. Após isso, a mistura estará pronta para ser levada à tina de mostura principal com temperatura de 35 °C (Figura 20). O ajuste da programação das rampas de temperaturas com a adição do adjunto

(temperatura de fervura), levará a tina principal a temperaturas próximas de sacarificação (hidrólise do amido) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

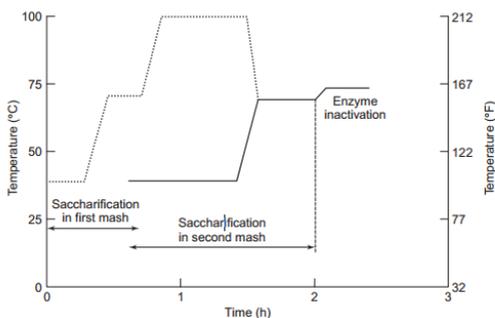
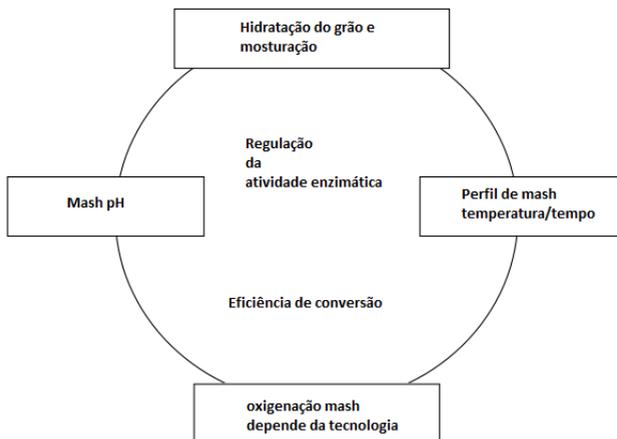


Figura 20. Rampas de mosturação em função da temperatura para adjuntos (.....) e para cevada maltada (\_\_\_) (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

A maioria das substâncias do malte ainda estão insolúveis. Somente substâncias solúveis são capazes de fazer parte da cerveja, portanto é necessária a conversão de substâncias insolúveis em substâncias solúveis a partir do processo de mosturação ou *mashing* (KUNZE, 1999). O objetivo da mosturação ou produção do mosto cervejeiro é tornar o grão tão fino que se possa hidratar com água quente, se tornar solúvel e ser atacado pelas enzimas para se converter em açúcares fermentáveis (hidrólise), além de disponibilizar proteínas, aminoácidos, dextrinas e íons para os processos enzimáticos. Nesse sentido, deve-se considerar que todo o processo enzimático depende da temperatura, do tempo, do grau de acidez e concentração do meio e qualidade do malte (VENTURINI, 2010).

A chave para o sucesso está em controlar os seguintes parâmetros (Figura 21).



Controle de Processo	Gerenciamento de Processo
Grãos moídos Volume e fluxo de água Temperatura da água Homogeneização do mash Temperaturas do mash Controle de Equipamento	Especificação do malte, Especificação da água, Eficiência de conversão, composição do mosto: cor, pH, $\text{eP}$ , viscosidade, completa degradação do amido, % fermentabilidade de açúcares, proporção proteína:polipeptídios:FAN

Figura 21. Mashing: parâmetros a serem controlados, adaptado pelo autor (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

Durante o processo de mosturação, as faixas ou rampas de temperaturas iniciais para uma boa condução enzimática, estão esquematizados na Tabela 10.

Tabela 10. Temperatura e pH ótimos com suas respectivas enzimas atuantes.

Enzimas	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Substrato	Inativação (°C)
Hemicelulases	40-45	4,5-4,7	Hemicelulose	50
Exopeptidases	40-50	5,2-8,2	Proteínas	55
Endopeptidases	50-60	5,0	Proteínas	70
Dextrinase	55-60	5,1	Amido	65
$\beta$ -amilase	60-65	5,4-5,6	Amido	70
$\alpha$ -amilase	70-75	5,6-5,8	Amido	80

Fonte: (ESSLINGER & NARZISS, 2005)

i) Temperatura, 35-40 °C, liquefação do substrato (grãos) e das enzimas presentes no malte, onde o malte moído é misturado com água nesta faixa de temperatura na proporção 1/4 (1 porção de malte para 4 porções de água Kg/L). O pH inicial é dependente do tipo de cerveja a ser confeccionado, porém uma faixa média de ajuste, compreende pH de 5,2 a 5,6. Podendo ser ajustados com ácidos láctico, fosfórico ou clorídrico (ESSLINGER & NARZISS, 2005).

ii) Temperatura, 40-44 °C, ocorre a solubilização e gelatinização do malte e ação das enzimas  $\beta$ -glucanases, degradando as paredes celulares do endosperma composta de proteínas, celulose e hemicelulose, ligados pelas ligações de  $\beta$ -glucanos. Esses compostos se não forem corretamente degradados, podem formar géis e aumentar a viscosidade do mosto dificultando na filtração. Moléculas de  $\beta$ -glucanos podem estar associadas nas paredes celulares com as moléculas de proteínas, por meio de ligações de pontes de hidrogênio. Isso acontece em maltes pouco modificados, por exemplo: milho (PRIEST & STEWART, 2006).

iii) Temperatura, 50-55 °C, esta fase é chamada comumente de parada protéica. A degradação das proteínas se deve as enzimas proteases e peptidases. As peptidases promovem a formação de aminoácidos contribuindo para a nutrição das leveduras. As proteases degradam as proteínas de alta massa molecular, em proteínas de média massa molecular promovendo a turbidez e formação de espuma. Nesta faixa de temperatura promove também a clarificação da cerveja, pela degradação de proteínas de alta massa molecular (KUNZE, 1999).

iv) Temperatura, 60-65 °C, as enzimas  $\beta$ -amilases são otimizadas nessa faixa, produzindo maltose em maior proporção, resultando em cervejas com mais extrato fermentável, menos corpo (dextrinas) e maior grau alcoólico. A  $\beta$ -amilase é uma exoenzima que ataca a molécula de amido, a partir do final não-redutor, liberando unidades de maltose. Outra enzima importante que abrange a faixa de 55-60 °C é a dextrinase ou dextrina limite, elas clivam ligações ( $\alpha$ -1,6) glicosídicas da amilopectina e são essenciais para a completa degradação do amido. Devido a sua baixa atividade e temperatura de inativação perto dos 65 °C, a contribuição para o mosto cervejeiro é muito baixa em termos de degradação do amido (ESSLINGER & NARZISS, 2005).

v) Temperatura, 70-75 °C, as enzimas  $\alpha$ -amilases são otimizadas nessa faixa, produzindo glicose e em sua maior parte a contribuição será em dextrinas, extrato não fermentável que resultará em maior corpo a cerveja, isto se deve ao fato deste açúcar não ser fermentável para as espécies de leveduras *S. cerevisiae* e *S.pastorianus*. A  $\alpha$ -amilase é uma

metaloenzima que age sobre a estrutura do amido desordenadamente, hidrolisando ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). O final da mosturação acontece na faixa de temperatura de 70-75 °C, sendo realizado o teste de iodo 0,2 N a fim de verificar a completa sacarificação do malte (degradação da amilose). Após a confirmação pela ausência da cor roxo-azulada, característica do iodo com amido, a solução é então aquecida entre 76-78 °C com objetivo de interromper a ação das enzimas, para obtenção de controle do “corpo” da cerveja e da melhora na filtrabilidade (VENTURINI, 2010). A composição de açúcares no mosto cervejeiro é extremamente dependente da atividade enzimática obtida durante a etapa de mosturação. Uma vez que a concentração de vários açúcares e dextrinas no mosto irão afetar o curso da fermentação e qualidade da cerveja. Sendo que estes fatores devem ser conhecidos pelo mestre cervejeiro.

#### 2.4.2. Fermentação e Maturação

Malteação e fermentação são as principais etapas dentro do processo de produção de cerveja. É durante a fermentação que ocorre a transformação do mosto em cerveja, sendo que nessa etapa ocorre a formação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e etanol pela levedura em anaerobiose, além de compostos de aroma e paladar (*flavour* da cerveja) (KUNZE, 1999).

O objetivo da fermentação é conduzir as interações dos parâmetros de processo para obter a cerveja com características sensoriais e físico-químicas desejadas. Todos os carboidratos fermentáveis são metabolizados pelas leveduras. Numerosos subprodutos se desenvolvem durante a fermentação, sendo que vários produtos intermediários permanecem no líquido e muitos são assimilados posteriormente pela levedura. Todos os compostos envolvidos com a assimilação, formação de produtos e subprodutos, influenciam no aroma, no paladar e nas características finais da cerveja pronta. As leveduras produzem compostos de aromas e sabor na cerveja como subprodutos de seu metabolismo, sendo que teores desses compostos variam com padrões de crescimento celular que são influenciados pelas condições de processo. Com isso, a influência das condições de fermentação, tais como composição e concentração, a temperatura de fermentação, o nível de oxigênio inicial, a concentração e viabilidade celular, produção de etanol e duração do processo fermentativo tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores (VENTURINI, 2010).

Assim como na fermentação, a maturação é necessária e importante. No processo de maturação, devem-se levar em consideração 3 fatores. O grau de fermentação (atenuação pelas leveduras) ou extrato aparente (medida do extrato levando em conta a presença de álcool), a temperatura e principalmente o diacetil. O diacetil é um subproduto formado durante o processo de fermentação. A Figura 22, representa o metabolismo de carboidrato, sendo o diacetil o subproduto mais conhecido na indústria cervejeira (SENAI, 2004). Diacetil (2,3 butanodiona) e 2,3 pentanodiona são produzidos em todas as fermentações de cervejas, o diacetil em particular possui um intenso dulçor e aroma de manteiga. Porém este atributo não pode ser tolerado em cervejas do tipo lager, e sua concentração final deverá ficar < 0,1 mg/L (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). As dicetonas viciniais são os dois principais produtos pesquisados no processo fermentativo na produção de cerveja (VENTURINI, 2010).

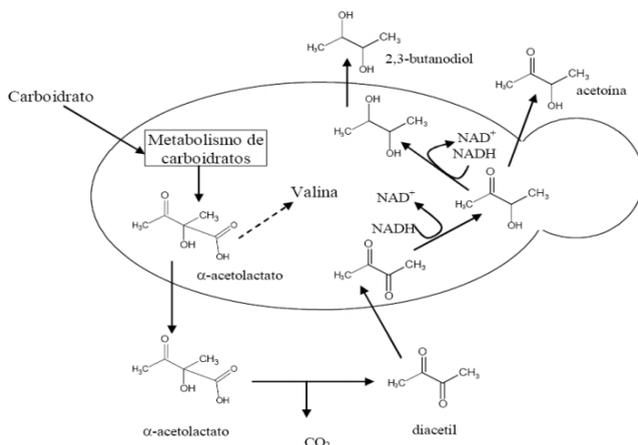


Figura 22. Metabolismo de carboidratos com subprodutos intermediários ( $\alpha$ -acetolactato e diacetil) e produtos finais de fermentação (2,3 butanodiol e acetoina) (CARVALHO, 2009).

O precursor do diacetil, o  $\alpha$ -acetolactato, é produzido pela levedura quando da síntese de aminoácidos valina e leucina, necessários para a síntese proteica. Uma série de reações similares ocorre para a formação de 2,3 pentanodiona, cujo precursor é o  $\alpha$ -acetohidroxibutirato, produzido pela levedura quando da síntese do aminoácido isoleucina (PRIEST & STEWART, 2006). Os precursores  $\alpha$ -acetolactato e  $\alpha$ -acetohidroxibutirato que deixam a célula durante a fermentação sofrem uma descarboxilação oxidativa formando as

respectivas dicetonas. As dicetonas são produzidas e depois reduzidas pela levedura, após o consumo dos açúcares fermentáveis no final da fermentação e início da maturação (VENTURINI, 2010). Os seguintes fatores podem influenciar no teor final de diacetil (KUNZE, 1999; SENAI, 2004):

- Insuficiência do aminoácido valina no mosto. Quanto menor a presença de valina, maior é a produção do precursor do diacetil ( $\alpha$ -acetolactato) e, conseqüentemente, do teor final em diacetil;
- Incorporação de oxigênio em presença da levedura, após a primeira fase da fermentação principal, como, por exemplo, na trasfega da cerveja para maturação;
- Levedura em estado fisiológico deficiente. Leveduras com boa vitalidade e viabilidade são fatores essenciais para uma baixa produção e alta assimilação de dicetonas.

A concentração dessas dicetonas ao final da fermentação é determinada pelo balanço entre a síntese e secreção de  $\alpha$ -acetohidroxi-ácidos formado a partir do ácido pirúvico e suas subsequentes conversões (KUNZE, 1999). A formação dessas vicinais dicetonas é influenciada por vários fatores, mas a concentração final é predominantemente dependente da atividade da levedura ao final da fermentação principal. O aumento na velocidade de crescimento da levedura é acompanhado por uma diminuição da concentração de precursores da dicetonas vicinais (acetolactato e acetohidroxi-butirato). Essa concentração dos precursores pode ser controlada se a velocidade de crescimento da levedura durante a fermentação também for controlada. O crescimento da levedura é acelerado por um aumento na aeração, agitação, elevação da temperatura e pela redução de pressão. O crescimento é retardado pela redução da aeração e agitação, diminuição da temperatura e ocorrência de pressurização. Durante o curso da fermentação do mosto, a formação de compostos que influenciam o sabor da cerveja apresenta uma boa correlação com o crescimento da levedura. O crescimento da levedura por sua vez, apresenta uma boa correlação com o pH e consumo de aminoácidos (VENTURINI, 2010).

Um período de refrigeração em temperaturas maiores, aproximadamente (2-3 dias em temperatura de 14-16 °C) possibilita que a levedura reduza o diacetil contido na cerveja (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004). Após terminado esta pequena etapa, inicia-se de fato o processo de maturação, no qual a cerveja é armazenada em baixas temperaturas, possibilitando o desenvolvimento de reações proporcionando as características organolépticas finais de produto.

Durante o período de maturação são formados ésteres responsáveis pelo aroma e sabor que caracterizam a cerveja; entre os ésteres predominam o acetato de etila (21,4 mg/L) e o acetato de amila (2,6 mg/L) (VENTURINI, 2010).

#### 2.4.3. Potenciais eletroquímicos (redox) e aromas

Muitas reações de importância na natureza envolvem tanto elétrons como prótons, o que faz com que sejam governadas tanto pelo pH como pelo potencial de oxidação-redução (Eh). Medidas eletroquímicas de potencial redox são feitas de modo similar às medidas de pH, utilizando um voltímetro de alta impedância (pHmetro comercial), um eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (ou um eletrodo combinado) (JARDIM, 2014).

Para interpretar adequadamente os valores de potencial redox obtidos para uma determinada amostra, deve-se considerar primeiramente as condições de contorno impostas pela termodinâmica. Os diagramas pH x Eh são construídos tendo como limite superior a oxidação da água ( $Eh_b = 1,229 - 0,0592 pH$ ), enquanto que o limite inferior trata da redução da água (equação  $Eh_a = 0 - 0,0592 pH$ ). Usando a faixa de pH que se estende de 0 até 14, o diagrama, a 25 °C, toma a forma demonstrada na Figura 23. Valores positivos de Eh indicam condições oxidantes, enquanto que valores negativos indicam disponibilidade de elétrons, ou condições redutoras (JARDIM, 2014).

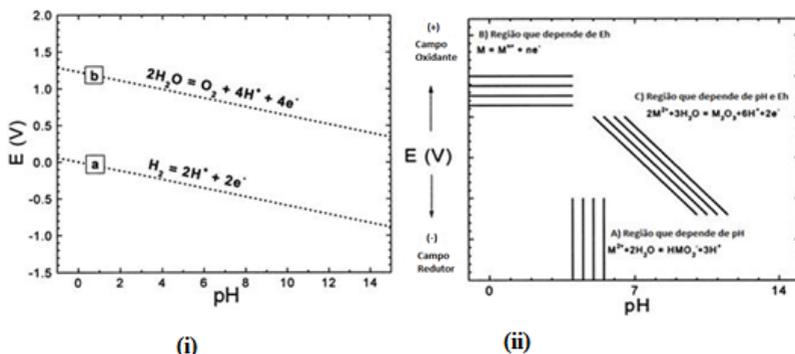


Figura 23. i) Diagrama de Pourbaix da água a 25 °C (ii) e esquema genérico de um diagrama de Pourbaix adaptado por (O'KEEKE, 2001).

O Diagrama de *Pourbaix* (i da Figura 23) a ser estudado está compreendido entre as linhas pontilhadas ‘a’ e ‘b’. Essas linhas obedecem às equações de primeiro grau relativos a oxidação e redução da água, como já mencionados. As linhas de base qualitativa do diagrama de *Pourbaix* são usadas para expressar linhas de equilíbrios, que irão definir os campos potenciais de maior estabilidade (eletroquímica e termodinâmica). Com base no diagrama de *Pourbaix* e suas respectivas equações, teremos informações para construção do diagrama de pH e Eh (ii da Figura 23), sendo que as linhas horizontais nos informarão reações eletroquímicas que envolvem reações eletrônicas ( $e^-$ ), porém não envolvem prótons ( $H^+$ ). Já as linhas verticais dependentes do pH, envolvem reações com ( $H^+$ ), porém sem reações de ( $e^-$ ). As linhas oblíquas, envolvem tanto reações de ( $H^+$ ) quanto ( $e^-$ ) (O’KEEKE, 2001).

Os valores de potencial redox medidos em sistemas naturais deverão se situar dentro dos limites mostrados no diagrama, o que possibilita apontar as espécies predominantes que devem ser encontradas nas amostras investigadas (JARDIM, 2014).

O pH e o oxigênio são considerados como os principais fatores que influenciam a estabilidade organoléptica da cerveja (FRANÇOIS, GUYOT-DECLERCK *ET AL.*, 2006). Assim, nesse contexto, esta proposta de investigação baseou-se no estudo simultâneo das estabilidades termodinâmica (pH) e eletroquímica (Eh) do meio reativo. Especificamente foi adotado o uso de diagramas do *Pourbaix*, exemplificado na Figura 23 (O’KEEKE, 2001).

### 3. OBJETIVO GERAL

- Desenvolver uma cerveja utilizando a farinha de pinhão (*Araucária angustifolia*) como adjunto na produção de cerveja.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar a composição centesimal da farinha de pinhão;
- Determinar as umidades das farinhas de pinhão elaboradas neste trabalho.
- Determinar o perfil viscoamilográfico das farinhas de pinhão, *in natura* crua e congelada e a farinha pre-gelatinizada;

- Verificar e comparar as temperaturas de gelatinização das farinhas de pinhão, *in natura* crua, *in natura* congelada e a pre-gelatinizada;
- Verificar através de microscopia eletrônica de varredura as formas dos grânulos das farinhas de pinhão, *in natura* crua, *in natura* congelada e a pre-gelatinizada;
- A partir do menor ponto de gelatinização dos 3 tipos de farinha supracitadas, confeccionar três tipos de cervejas do tipo Ale com: 0, 20 e 50 g/100g da farinha de pinhão em massa;
- Acompanhar o processo fermentativo da levedura American Ale, *Saccharomyces cerevisiae* para as três cervejas, compreendendo os seguintes parâmetros: crescimento celular (densidade óptica e contagem celular), densidade específica inicial e final, teor alcoólico teórico, extrato aparente, extrato real, extrato primitivo e desempenho da levedura (atenuação aparente %);
- Analisar o perfil dos potenciais físico-químicos como o pH e o potencial redox (eh/mV) durante o processo fermentativo correlacionando-os com o crescimento celular;
- Verificar o perfil cromatográfico de compostos voláteis das cervejas produzidas com 0, 20 e 50 g/100g de farinha de pinhão utilizando a técnica de cromatografia a gás com detector de massas (CG-MS);
- Verificar o perfil cromatográfico de compostos voláteis da água do cozimento do pinhão e comparar com o perfil das cervejas produzidas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Extração e análises da farinha de pinhão

#### 4.1.1. Local de execução

Os experimentos com a farinha de pinhão foram divididos em duas classes: i) Farinhas de pinhão *in natura* crua (CRU) e farinha de pinhão *in natura* congelada (CONG) e ii) farinha de pinhão pre-gelatinizada (GEL), previamente autoclavada a 1,5 atm por 20 minutos. Estes experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento

de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina na cidade de Florianópolis (SC).

#### 4.1.2. Matérias primas

Para realizar este trabalho, foram adquiridos pinhões da safra de 2014, em mercado local de Florianópolis (SC). Os pinhões adquiridos foram divididos em lotes, no total de 20 Kg, sendo que o primeiro lote denominado pinhão fresco cru *in natura*, foi primeiramente lavado com água corrente, seco à temperatura de 25°C e refrigerado em temperatura de 6°C por 24 h, até seu uso. O segundo e o terceiro lotes, foram armazenados e acondicionados em embalagens de polietileno, identificado e mantido sob congelamento a -20 °C, até seu uso. A escolha do tempo e a temperatura de secagem foram baseadas nas utilizadas em grãos de trigo e cevada, com 4 h à 65 °C, de acordo com (CAPELLA, 2008).

#### 4.1.3. Obtenção da farinha crua de pinhão *in natura* (CRU)

##### A) Farinha de pinhão crua *in natura* sem casca interna

Para a secagem, os pinhões foram abertos com o auxílio de um dispositivo tipo guilhotina para separação do epicarpo (casca externa), após retirou-se uma segunda e fina película aderida à semente, que chamaremos de casca interna. Após esses procedimentos as sementes foram trituradas em um multiprocessador doméstico (marca Walita e potencia de 500 watts). Os fragmentos foram distribuídos em bandejas com tela de nylon e foram submetidos à secagem em estufa a 65 °C com circulação forçada de ar, por 4 h. O material desidratado foi novamente triturado e após, peneirado com granulometria da farinha em 250 µm (60 mesh).

##### B) Farinha de pinhão crua *in natura* com casca interna

Para a secagem, os pinhões foram abertos com o auxílio de um dispositivo tipo guilhotina para separação do epicarpo (casca externa), a segunda e fina película aderida à semente foi mantida. Os demais procedimentos foram os mesmo para obtenção da farinha de pinhão crua *in natura* sem casca interna.

#### C) Farinha de pinhão crua *in natura* germinado

Para a secagem, os pinhões germinados foram abertos com o auxílio de um dispositivo tipo guilhotina para separação do epicarpo (casca externa). Os demais procedimentos foram os mesmo para obtenção da farinha de pinhão crua *in natura* sem casca interna.

#### 4.1.4. Obtenção da farinha de pinhão cru e congelado (CONG)

##### D) Farinha de pinhão cru e congelado sem casca interna

Para a secagem, os pinhões após descongelados, foram abertos com o auxílio de um dispositivo tipo guilhotina para separação do epicarpo (casca externa), após foi retirado a segunda e fina película aderida à semente. Os demais procedimentos foram os mesmo para obtenção da farinha de pinhão crua *in natura* sem casca interna.

##### E) Farinha de pinhão cru e congelado com casca interna

Para a secagem, os pinhões congelados, foram abertos com o auxílio de um dispositivo tipo guilhotina para separação do epicarpo (casca externa), a segunda e fina película aderida à semente foi mantida. Os demais procedimentos foram os mesmo para obtenção da farinha de pinhão crua *in natura* sem casca interna.

#### 4.1.5. Obtenção da farinha de pinhão pré-gelatinizado (GEL)

##### F) Farinha de pinhão pré-gelatinizado

Para a pré-gelatinização, os pinhões congelados, foram inseridos em autoclave com 1,5 atm de pressão, temperatura de 120 °C por um período de 20 minutos. Após este procedimento levou-se a secagem. Antes da secagem, os pinhões foram abertos com o auxílio de um dispositivo tipo guilhotina para separação do epicarpo (casca externa). Os demais procedimentos foram os mesmo para obtenção da farinha de pinhão crua *in natura* sem casca interna.

#### 4.1.6. Análise centesimal das farinhas de pinhão

A análise centesimal foi determinada para as farinhas de pinhão elaboradas. Os teores de umidade em base seca, cinzas, proteínas,

lipídios, fibra alimentar total e amido total foram analisados conforme metodologia:

Umidade: Realizada em estufa com temperatura de 105 °C até peso constante, conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985d).

Cinzas: Resíduo por incineração ou cinzas, em mufla em temperatura de 550 °C até peso constante, com destruição da matéria orgânica até obtenção de cinzas claras conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985a).

Proteínas: Determinado por método de Kjeldahl, com uso de fator de 6,25 para conversão, conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985c).

Lipídios: Determinado por extração com solvente orgânico (éter etílico), em extrator Soxhlet e, após a eliminação do solvente, quantificados através da pesagem do resíduo, conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985b).

Fibra Alimentar Total: Determinado por combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos estabelecido pelo método da Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C, 2000a).

Amido Total: Determinado por métodos enzimáticos (amiloglicosidase) e oxidação com peróxido de hidrogênio estabelecido pelo método da Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C, 2000b).

#### 4.1.7. Análise de viscosidade das farinhas de pinhão

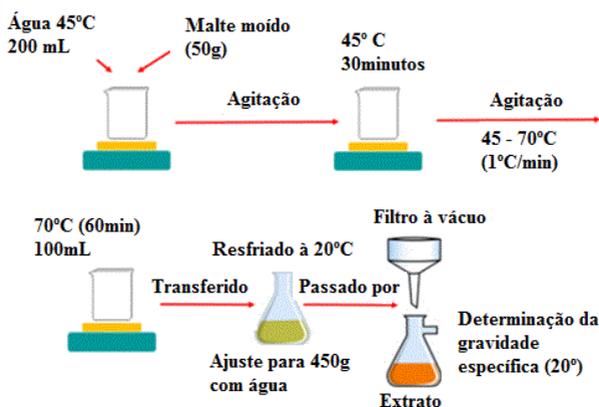
Para a determinação da viscosidade de pasta utilizou-se a metodologia de (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007). Foi utilizado o Analisador Rápido de Viscosidade (Rapid Visco™ Analyser 4500, RVA (4500)).

As amostras das três farinhas de pinhão (CRU) (A, B e C) foram analisadas no RVA. Para 3 g de cada amostra (umidade ajustada para 14 % em base úmida), foram adicionados 28 g de água destilada. As suspensões preparadas foram colocadas em recipientes de alumínio do equipamento, e analisadas. Agitou-se a solução durante um minuto manualmente, para certa homogeneização e a remoção de grumos e ar. O método padrão se processa durante 20-23 minutos de corrida. O equipamento inicia a análise equilibrando a temperatura até 50 °C por 1 minuto; após a amostra é aquecida até temperatura de 95 °C por 7,5 minutos, essa temperatura é mantida por 5 minutos. Após a amostra é resfriada até temperatura de 50 °C por 7,5 minutos, e mantida a 50 °C

por 2 minutos. Durante os 10 s iniciais a velocidade de rotação empregada foi de 960 rpm, após este tempo a velocidade de rotação permaneceu em 160 rpm. Foi utilizado o programa Thermocline for Windows v3 (TCW3), para coleta dos dados e análises dos resultados. As análises de RVA foram conduzidas em triplicatas.

#### 4.1.8. Metodologia utilizada para determinação do extrato solúvel (mosto congresso)

Este procedimento determina o potencial do malte para a produção de extrato solúvel (mosto) expresso pela gravidade específica e os parâmetros: teste de iodo, tempo de filtração do mosto, aroma, rendimento de extrato da amostra aquosa e rendimento do malte em base seca e cor, de acordo com o método EBC (European Brewery Convention) (E.B.C, 2004a) (Esquema 2).



Esquema 2. Determinação do extrato solúvel (também conhecido como mosto congresso), utilizado neste trabalho, conforme metodologia (E.B.C, 2004a), adaptado pelo autor.

Neste trabalho, utilizou-se o mosto congresso para calcular o extrato solúvel do adjunto (farinha de pinhão pré-gelatinizado, GEL) e a cevada maltada (CM) em diferentes porcentagens: As porcentagens utilizadas para cada mosto congresso, foram: 100 g/100g CM, (90-10 g/100g), (80-20 g/100g), (70-30 g/100g), (60-40 g/100g), (55-45 g/100g), (50-50 g/100g), (40-60 g/100g), (30-70 g/100g), (80-20 g/100g), (10-90 g/100g) e 100 g/100g GEL. A determinação do extrato solúvel de 100 g/100g de farinha de pinhão pre-gel (GEL) foi executada

utilizando a metodologia da ASBC (American Society of Brewing Chemists) (A.S.B.C, 1992) com algumas adaptações, sendo similar a metodologia da EBC (European Brewery convention) (E.B.C, 2004a). Para a determinação do mosto congresso da farinha 100 g/100g GEL, procedeu-se de forma semelhante ao Esquema 2, sendo inseridas as enzimas no início do processo. As enzimas utilizadas para hidrólise foram a malte diástase ( $\alpha$ -amilase obtido *Aspergillus oryzae*, 28,75 U/mg, EC 3.2.1.1) empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e a  $\alpha$ -amylase termoestável (3.000 U/mL, EC 3.2.1.1) empresa Magazyme (Wicklow, Irlanda).

#### 4.1.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras secas das farinhas de pinhão, CRU, CONG e GEL, foram fixadas em fita de carbono tendo como base, stubs de metal. Após isso, as amostras foram recobertas por uma camada fina de ouro de 350 Å de espessura. Estas foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), usando um microscópio da marca JEOL JSM-6390LV (Tóquio, Japão), do laboratório na Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, sendo operado nas potencias de 5 e 7kV. As fotomicrografias foram obtidas sob ampliação de 750 x e 1000 x.

#### 4.1.10. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software STATISTICA 7.0<sup>®</sup>. Os testes foram realizados em triplicata, sendo aplicada a análise estatística descritiva, Teste Tukey, análise de correlação e análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de probabilidade para comparação de médias.

### 4.2. Metodologia de confecção do mosto e fermentação alcoólica

#### 4.2.1. Local e equipamentos

O mosto cervejeiro foi confeccionado na Usina do departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFSC. As cervejas foram formuladas utilizando o programa cervejeiro *Beersmith*<sup>®</sup> 2.0 para padronização correta dos seguintes parâmetros (OG, gravidade original, IBU, unidades de amargor, EBC, cor e % ABV, porcentagem alcoólica aparente). A produção piloto compreende a parte quente e fria do processo e engarrafamento.

Utilizou-se 02 caldeirões de 35 L de capacidade para a fabricação. O processo utilizou chama como fonte de aquecimento, sendo i) um caldeirão para o processo de brassagem e filtração do bagaço, contendo sistema de filtração interno (bazooka) e torneira adaptada no fundo do caldeirão e ii) o segundo caldeirão, também com dispositivo de torneira no fundo do caldeirão, foi utilizado para o processo de fervura, lupulação, whirlpool e resfriamento do mosto. O acompanhamento da temperatura no caldeirão de brassagem foi por termômetro, sendo constantemente revolvido. A fermentação foi conduzida em fermentadores cônicos de polipropileno de 25 litros e uso de refrigerador com controle da temperatura.

#### 4.2.2. Preparo do mosto cervejeiro

Mosto 100 g/100g cevada maltada

O processo de brassagem para obtenção do meio de cultura utilizado (hidrolisado de malte) foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita por (STEWART, 2013), com adequações.

Para este estudo foi utilizado 100 g/100g malte base (cevada maltada) para a confecção do mosto hidrolisado e o malte seco tipo Pilsen fornecido pela empresa Brewtime®, sendo verificado a porcentagem de água através do laudo do malte. A mistura total de malte e água foi na proporção malte/água 1:4. Porém inicialmente para uma melhor condução do processo enzimático, essa proporção foi de malte/água 1:2,5. O malte foi moído em moinho adequado para expor o amido, para uma boa conversão amido/açúcares fermentáveis. Essa massa de malte aquosa foi conduzida a temperatura de 50 °C, sob controle de temperatura, com a proporção de água prevista. A mistura foi homogeneizada durante todo o processo com uma colher cervejeira previamente limpa. Essa temperatura foi mantida durante 30 minutos. Após esse período, com incrementos de 1 °C/minuto, elevou-se a temperatura através de rampas de temperatura, para 69 °C durante 30 minutos, sendo acompanhado pelo teste de iodo (Figura 24).

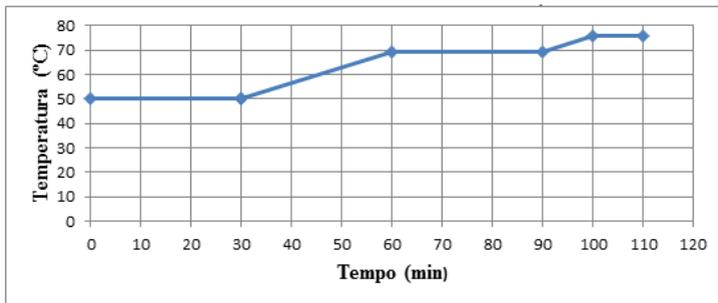


Figura 24. Programação de rampas de temperaturas, com infusão de malte de cevada, adaptado pelo autor (STEWART, 2013).

A temperatura e pH (5,2-5,6) foram rigorosamente controladas durante a brassagem. Após esse processo, desativou-se as enzimas em temperatura de 76 °C, por 10 minutos. Após a inativação enzimática, o mosto foi levado à fervura por 60 minutos. A fervura foi necessária para isomerizar os alfa ácidos do lúpulo em iso-alfa ácidos (sendo adotado 20 IBUS de dosagem), esterilizar o mosto, desnaturar, coagular as proteínas/polifenóis, em *trub* quente. Após o tempo de fervura, iniciou-se o *whirlpool*, um processo físico na qual a parte sólida (*trub* ou material mucilaginoso) é separado da fase líquida utilizando um vortex com posterior tempo de decantação. O próximo passo foi o resfriamento do mosto, sendo anotado a densidade relativa ( $\text{g/cm}^3$ ), através de densímetro de gravidade específica. A Tabela 11 demonstra as temperaturas ótimas e suas respectivas enzimas (VENTURINI, 2010).

Tabela 11. Atividade enzimática que ocorre durante a brassagem, temperaturas e pH ótimos para a ativação de enzimas responsáveis pela hidrólise dos carboidratos presentes no malte.

ENZIMAS	TEMPERATURA ÓTIMA (°C)	pH ÓTIMO
Hemicelulases	40-45	4,5-4,7
Exopeptidases	40-50	5,2-8,2
Endopeptidases	50-60	5,0
Dextrina	55-60	5,1
Beta-amilase	60-65	5,4-5,5
Afa-amilase	70-75	5,6-5,8

**Fonte:** (VENTURINI, 2010)

Mosto com 20 g/100g farinha de pinhão

Para esta formulação de mosto, foi utilizado 80 g/100g de malte base (cevada maltada) e 20 g/100g de farinha de pinhão pregelatinizado, para a confecção do mosto hidrolisado. Os demais controles de operação foram conforme item 4.2.2.

Mosto com 50 g/100g farinha de pinhão

Para esta formulação de mosto, foi utilizado 50 g/100g de malte base (cevada maltada) e 50 g/100g de farinha de pinhão pregelatinizado, para a confecção do mosto hidrolisado. Os demais controles de operação foram conforme item 4.2.2.

#### 4.2.3. Composição típica de um mosto cervejeiro

O mosto configurado no item 4.2.2 conterà basicamente em sua composição, açúcares como sacarose, glicose, frutose, maltose e maltotriose, além de dextrinas. Esta composição pode variar sensivelmente conforme as rampas de temperaturas escolhidas. A porcentagem típica do espectro destes açúcares (Tabela 12), demonstrado por (STEWART, 2013).

Tabela 12. Concentração típica dos açúcares no processo de mostura (obtenção do mosto).

Típica concentração de açúcares no mosto	
Açúcares	Composição (%)
Glicose	10–15
Frutose	1–2
Sacarose	1–2
Maltose	50–60
Maltoriose	15–20
Dextrinas	20–30

Fonte: (STEWART, 2013)

#### 4.2.4. Fermentação alcoólica

As fermentações foram elaboradas a partir do hidrolisado de malte produzido segundo metodologia descrita no item 4.2.2. Para cada formulação de cerveja foram utilizados fermentadores de capacidade de 25 litros de fundo cônico. Após o processo de esterilização e resfriamento, o mosto foi oxigenado e inoculou-se as leveduras cervejeiras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* da empresa Bio4<sup>®</sup> (American Ale – SY025) com a concentração celular recomendada pelo fabricante, ficando em torno de  $0,75-1 \times 10^6$  UFC/ml/°P. As fermentações foram mantidas em temperatura de 18 °C, sob sistema anaeróbico.

#### 4.2.5. Determinações Físico-químicas da fase fermentativa

As amostras foram coletadas para análise diariamente, durante os sete primeiros dias de fermentação, com acompanhamento densidade específica, pH, Eh, concentração celular (óptica e contagem celular) e álcool teórico. Após este período, deixou-se a cerveja em fase de maturação (1 °C) por 21 dias e iniciou-se as análises do extrato aparente, extrato real, extrato primitivo e desempenho da levedura (fermentabilidade) ou atenuação aparente (AA %) para cada formulação. Todas as amostras foram coletadas assepticamente, sendo efetuadas em triplicata.

#### 4.2.6. Procedimento das leituras

As amostras de cerveja foram descarbonatadas para remoção do CO<sub>2</sub>. A amostra então recolhida, foi transferida para um béquer e agitada com bastão de vidro (E.B.C, 2007). A determinação e acompanhamento do teor de sólidos solúveis foi feita através da análise de densidade específica aparente, através da análise direta pelo densímetro de gravidade específica (g/cm<sup>3</sup>) (E.B.C, 2004d). O acompanhamento das leituras de pH (E.B.C, 1999) & (E.B.C, 2004c) e o acompanhamento de eh (mV) foram de acordo com (LIU, LUI *ET AL.*, 2015), através do potenciômetro (pH metro digital, DLA-pH: DEL LAB), com os eletrodos: combinado (pH) e eletrodo de platina (eh). O acompanhamento do crescimento celular foi através da densidade ótica (DO<sub>1000nm</sub>, com espectrofotômetro pelo método Turbidimétrico), com comprimento de onda em  $\lambda=1000$  nm, conforme European Brewery Convention (E.B.C, 2011c). Para a determinação da contagem do número total de leveduras utilizou-se a câmara de Neubauer (E.B.C, 2011a) e o reagente utilizado para diferenciar células viáveis de não-viáveis, estimando assim a porcentagem de viabilidade celular foi o cristal violeta (E.B.C, 2011b). A avaliação do teor de álcool em volume nas amostras de cerveja foram obtidas teoricamente. Após a fase de maturação, foram determinadas: o extrato aparente, real e primitivo e a fermentabilidade (% Atenuação Aparente) conforme (EBC, 1997; E.B.C, 2004b).

Após o engarrafamento (utilização do método champenoise para recarbonatação, 5,5 g/L de açúcar) as garrafas foram conduzidas ao departamento de Química da UFSC, para determinação do perfil aromático por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas, CG-MS, das cervejas produzidas com 0, 20 e 50 g/100g de farinha de pinhão pre-gelatinizado. Preparou-se também, uma porção de sementes de pinhão que foram previamente autoclavadas em panela de pressão, por 20 minutos, pressão de 1,5 atm e temperatura de 120 °C. Engarrafou-se a parte aquosa para análise cromatográfica.

Para as análises de compostos voláteis utilizou-se a técnica de microextração em fase sólida (SPME) com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espessura de recobrimento. A metodologia de utilização foi de acordo com (VALENTE & AUGUSTO, 2000), quando a fibra foi esposta no *headspace* de 5 mL de amostra à 35 °C, com tempo de extração de 30 minutos e tempo de dessorção no equipamento de 15 minutos. Os experimentos foram realizados no Departamento de

Química da UFSC, no laboratório de Cromatografia e Espectrometria Atômica.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo equipado com detector de massas CG-MS QP 2010 Plus (Shimadzu, Japão), com coluna capilar Zebtron ZB-5MS de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 um. As condições cromatográficas do experimento foram: rampa de aquecimento: 40 °C durante 4 minutos, após novo aquecimento até atingir 240 °C, em uma taxa de 5 °C/min, com tempo total de corrida de 44 minutos. Utilizou-se gás Hélio como gás de arraste, com vazão de 1 mL/min. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram analisados com o software (CG-MS Real Time Analysis).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Composição centesimal das farinhas de pinhão

O pinhão da *A. angustifolia* é uma semente recalcitrante, apenas a secagem não seria o suficiente para armazená-la de forma a não comprometer sua viabilidade e degradação, por isso a opção de transformá-la em farinha é uma alternativa para sua conservação, além do aumento da superfície de contato para confecção de cerveja (facilitando a hidrólise). O teor de umidade para as sementes de pinhões é um fator importante, visto que aproximadamente a metade de sua massa é constituída de água. Resultados obtidos neste trabalho (sem tratamento prévio) variaram entre 43,45 a 48,09 g/100g para os três diferentes tipos de farinhas (CRU, CONG e GEL). Foi constatado que houve diferença estatística significativa para o teor de umidade dos três tipos de farinhas, conforme ilustrado na Tabela 13.

O uso de técnicas de secagem e extração do amido são de fundamental importância para sua posterior utilização, (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006; STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007; CONFORTI & LUPANO, 2008; CAPELLA, PENTEADO *ET AL.*, 2009; COSTA, LEIVAS *ET AL.*, 2013). A baixa concentração de água nas farinhas de pinhão (CRU, CONG e GEL) promove grande estabilidade microbiológica e físico-química, facilitando o transporte e armazenamento.

A metodologia de secagem para as farinhas da semente de pinhão desenvolvida neste trabalho ficaram em sua média com teores de umidade de 6 a 9 g/100g em base seca. Estes valores estão próximos aos encontrados por (COSTA, LEIVAS *ET AL.*, 2013), com faixas de 6 a 7,4

g/100g. Para o procedimento de secagem, descrito no item 4.1.3, o teor de umidade de todas as farinhas ficaram dentro das exigências da legislação de farinhas do Brasil, cuja umidade não deve exceder a 15 g/100g (BRASIL, 2005).

Os resultados obtidos na análise centesimal (Umidade, umidade em base seca, cinzas, proteínas, lipídios, fibra alimentar e amido total) para as farinhas de pinhão estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Análise centesimal das farinhas de pinhão.

Composição centesimal (g/100g)	Cru sem casca interna	Cru com casca interna	Germinado	Congelado sem casca interna	Congelado com casca interna	Pregelatinizado
Umidade	47.30±1.22 <sup>b</sup>	45.62±0.77 <sup>c</sup>	Nd	46.73±0.52 <sup>b</sup>	48.09±0.26 <sup>a</sup>	43.45±0.7 <sup>d</sup>
Base seca	6.93±0.05 <sup>c*</sup>	7.09±0.01 <sup>c*</sup>	9,35±0.11 <sup>a</sup>	8.95±0.03 <sup>b*</sup>	9.06±0.05 <sup>b*</sup>	6.38±0.05 <sup>d*</sup>
Cinzas	2.51±0.18 <sup>a*</sup>	2.55±0.21 <sup>a*</sup>	3,45±0.20 <sup>b</sup>	-	-	-
Proteína	6.36±0.19 <sup>a*</sup>	5.13±0.15 <sup>b*</sup>	10,32±0.11 <sup>b</sup>	-	-	-
Lipídios	0.97±0.01 <sup>a*</sup>	1.17±0.08 <sup>a*</sup>	1,06±0.06 <sup>a</sup>	-	-	-
Fibras totais	5.2±0.28 <sup>a*</sup>	5.05±0.35 <sup>a*</sup>	6,73±0.23 <sup>b</sup>	-	-	-
Amido	63.75±1.63 <sup>a,b*</sup>	59±2.97 <sup>b*</sup>	57,8±0.57 <sup>b</sup>	-	-	68.30±1.13 <sup>a*</sup>

\*Resultados expressados em base seca. A média ± desvio padrão seguido de mesma letra não possui diferença significativa pelo teste de Tukey (p <0,05).

Sobre a composição centesimal do pinhão é possível observar a baixa concentração de cinzas, fibras totais e proteínas. Foi constatado que houve diferença significativa entre as análises, porém o fator mais preocupante foi a proteína com 10,32 g/100g para a farinha germinada. Caso for a opção do cervejeiro, deve-se utilizar em proporções moderadas, mesmo tendo a oferta de enzimas promovida pela germinação. O excesso de proteínas, por exemplo: >10 g/100g e temperaturas baixas, tenderá a precipitação promovendo uma turvação coloidal a frio (ligações de polipeptídios e polifenóis), chamado de “chill-haze”, prejudicando o processo de clarificação (PRIEST & STEWART, 2006). Os benefícios de uma baixa concentração (entre 5-6 g/100g das farinhas *in natura*) de proteínas para a confecção de cervejas são: favorecimento e rapidez no processo de maturação da cerveja (LEIPER & MIEDL, 2009), alguns dos principais fatores atribuídos a má formação de espumas em cervejas, são os lipídios (BAMFORTH, C. W., 2003). Neste contexto, a baixa concentração de lipídios para as farinhas de pinhão (0,97, 1,17 e 1,06 g/100g) contribuem positivamente para a estabilidade físico-química da cerveja. Outros cereais, como a cevada, o milho e o trigo, possuem valores mais elevados em comparação ao pinhão, compreendendo a faixa de (2,9

g/100g), (4,3 g/100g) e (2 g/100g), respectivamente (Tabela 14), ainda assim, são muito utilizados pelas indústrias cervejeiras.

Tabela 14. Propriedades Físico-química de alguns adjuntos em base seca.

Composição Química (g/100g)	Adjuntos Cervejeiros				
	Milho ( <i>Zea mays</i> )	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	
<b>Umidade</b>	11-13	12,9	12-14,0		13,0
<b>Cinzas</b>	1,4	0,5	2,9		1,5
<b>Proteínas</b>	9,5	6,8	11,1		12,0
<b>Lipídios</b>	4,3	0,62	2,9		2,0
<b>Fibra totais</b>	9,5	1,4	5,9		2,0
<b>Amido</b>	71,7	77,8	63,2		60,0

Fonte: (ANNEMULLER & MANGER, 2013)

Valores de fibras totais para a semente de pinhão em comparação a cevada são bem próximos, (5,05, 5,2 e 6,7 g/100g) e (5,9 g/100g), respectivamente. Neste caso, além de não possuir cascas, uma alta quantidade de farinha de pinhão poderia dificultar o escoamento do mosto, devido ao seu aspecto gelatinoso, no processo de lavagem dos grãos *lauter tun*, causando diminuição na eficiência.

Os valores de carboidratos totais (amido total) encontrados neste trabalho para a farinha da semente de pinhão variaram de 57,8 a 68,3 g/100g, ficando próxima da média dos encontrados em literatura. Alguns valores superiores encontrados por (COSTA, LEIVAS *ET AL.*, 2013) em torno de 88 g/100g e inferiores encontrados por (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006) com 34 g/100g, todavia ficando relativamente próximos aos valores de (DAUDT, KÜLKAMP-GUERREIRO *ET AL.*, 2014) que foi de 72 g/100g, em base seca.

Essas variações encontradas nas proporções de amido e suas possíveis explicações estão em condições imposta pelo meio ambiente, condições edafoclimáticos, assim como diferentes metodologias de extração. Uma das características desejáveis aos adjuntos cervejeiros, quando estes de fontes amiláceas, é a substituição por parte do malte, quer seja pelo valor, quer seja para atribuir características próprias peculiares ao produto final. As concentrações de amido da semente de

farinha de pinhão encontradas neste trabalho foram em média (aproximadamente de 62 g/100g), sendo bem próximas em comparação à cevada (63,2 g/100g), trigo (60 g/100g), milho (71,7 g/100g) e arroz (77,8 g/100g) (ANNEMULLER & MANGER, 2013).

## 5.2 Viscoamilogramas das farinhas de pinhão

Segundo (YAO, WHITE *ET AL.*, 2011) o amido e outros carboidratos solúveis são os principais contribuintes para a viscosidade. A viscosidade de pasta é importante na avaliação da qualidade do amido uma vez que a fluidez pode interferir nos equipamentos a serem utilizados e dimensionados numa linha de produção, até no produto a ser fabricado (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006).

Os viscoamilogramas são utilizados para verificar as propriedades físico-químicas de cereais, assim como outras fontes de amido. A importância do viscoamilograma para a determinação tecnológica de uma fonte de amido com vistas a confecção de cervejas está na temperatura de pasta e gelatinização.

A temperatura de pasta é obtida através de viscoamilograma pelo ponto onde a viscosidade da suspensão começa a aumentar, na ocasião do aquecimento da pasta, a partir de 50 °C. Com a temperatura aumentando inicia a gelatinização do amido, neste ponto ocorre desestabilização nos grânulos de amido com hidratação gradual, fisicamente ocorre expansão e posterior destruição com rompimento das estruturas amorfas e cristalinas, sendo observados pelo gradual aumento da viscosidade (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006; STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007).

Na Figura 25 e Tabela 15 estão apresentados os perfis e os dados relativos às medias das análises dos viscoamilogramas das farinhas da semente de pinhão, de acordo com a metodologia de (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007).

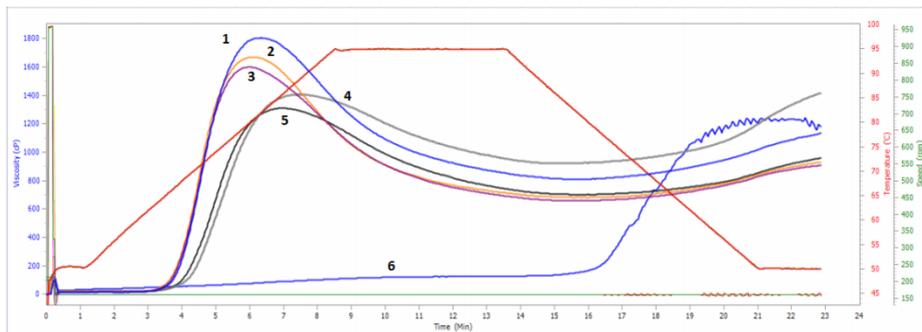


Figura 25. Curvas de RVA das farinhas de pinhão: 1- CRU sem casca interna; 2- Germinado; 3- CRU com casca interna; 4- CONG sem casca interna; 5- CONG com casca interna e 6- pré-gelatinizado GEL.

Tabela 15. RVA dos resultados das amostras das farinhas de pinhão

Amostras	Pico Viscosidade (cP)	Pico Temperatura (°C)	Trough (cP)	Breakdown (cP)	Viscosidade Final (cP)	Setback (cP)	Tempo Pico (min)
1	1814.5±0.88 <sup>a</sup>	81.67±0.25 <sup>c</sup>	814.5±0.77 <sup>b</sup>	1000±0.12 <sup>a</sup>	1144.5±1.12 <sup>a,b</sup>	327±0.35 <sup>a</sup>	6.26±0.09 <sup>d</sup>
2	1668.5±0.06 <sup>b</sup>	80.12±0.67 <sup>d</sup>	681±0.0 <sup>c,d</sup>	987.48±0.06 <sup>a</sup>	930.96±0.0 <sup>b</sup>	249.96±0.0 <sup>a</sup>	6.03±0.05 <sup>d,e</sup>
3	1618±2.24 <sup>c</sup>	79.47±0.04 <sup>d</sup>	663.96±0.71 <sup>d</sup>	954±1.53 <sup>b</sup>	917.52±1.12 <sup>b</sup>	253.50±0.42 <sup>a</sup>	5.93±0.0 <sup>e</sup>
4	1343.5±0.88 <sup>d</sup>	88.32±0.25 <sup>a</sup>	876.54±1.24 <sup>a</sup>	467.04±0.35 <sup>d</sup>	1347±3.30 <sup>a</sup>	470.52±2.06 <sup>a</sup>	7.36±0.05 <sup>b</sup>
5	1311±0.11 <sup>d</sup>	85.72±0.25 <sup>b</sup>	700.02±0.12 <sup>c</sup>	610.98±0.23 <sup>c</sup>	972.54±1.59 <sup>b</sup>	272.52±1.71 <sup>a</sup>	6.96±0.05 <sup>c</sup>
6	10.6±0.18 <sup>e</sup>	<< 78 <sup>c</sup>	10.66±0.15 <sup>e</sup>	--	1090.98±11.61 <sup>a</sup>	7.74±1.13 <sup>b</sup>	12.7±0.14 <sup>a</sup>

A média ± desvio padrão seguido de mesma letra não possui diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 1- Farinha de pinhão (CRU) sem casca interna; 2- Farinha de pinhão germinada; 3- Farinha de pinhão (CRU) com casca interna; 4- Farinha de pinhão (CONG) sem casca interna; 5- Farinha de pinhão (CONG) com casca interna; 6- Farinha de pinhão (GEL) pré-gelatinizado.

Para as farinhas de pinhão produzidas neste trabalho, obteve-se três perfis distintos. Para as farinhas cruas *in natura*, viscoamilogramas (1 e 3) os picos de viscosidade ficaram na faixa de 1.600 a 1.800 (cP) com picos de temperaturas entre 80 e 81 °C. Já para a farinha de pinhão *in natura* germinado, viscoamilograma (2), esta não mostrou significativa mudanças no pico e temperatura e gelatinização, devido ao breve tempo de processamento pelas enzimas internas da semente ou mesmo pela desativação enzimática através do processo térmico de secagem.

Para as farinhas de pinhão cruas congeladas, viscoamilogramas (4 e 5) os picos de viscosidade foram mais baixos que as farinhas cruas *in natura*, em torno de 1.300 (cP), porem com picos de temperaturas maiores, na faixa de 85-88 °C. As temperaturas de gelatinização para as farinhas de pinhão do tipo *in natura*, viscoamilogramas (1 a 5) ficaram numa faixa de 79-88 °C, valores próximos aos encontrados por (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007), 89,2 °C.

Os resultados de viscosidade para a farinha de pinhão pré-gelatinizado, viscoamilograma (6), indicou valores inferiores as demais farinhas. Com o amido gelatinizado, os principais componentes que contribuem à viscosidade foram as  $\beta$ -glucanas e as proteínas. Nesta condição, o pico de viscosidade diminuiu significativamente depois da gelatinização.

Os picos de temperaturas encontrados por (COSTA, LEIVAS *ET AL.*, 2013), ficaram na faixa de 54-63 °C. Esta diferença pode estar associada a baixa concentração de amilose, similarmente encontrado por (ZAIDUL, NORULAINI *ET AL.*, 2009) em amido de batatas.

Segundo os autores (ANNEMULLER & MANGER, 2013) temperaturas de gelatinização de fontes amilácea maiores que 78 °C deverão passar por processos térmicos isolados (decocção ou alta pressão) antes de ser inseridos no processo de mosturação *mash in*. Este processo é mais econômico, com reduzido consumo de energia e otimização de tempo no processo de mosturação.

A importância em conhecer as temperaturas de gelatinização das fontes de amido é fator tecnológico essencial, assim como financeiro.

Após o pico de gelatinização obtido através dos perfis dos viscoamilogramas, ocorre um platô de temperatura e posterior decaimento da viscosidade. É durante a fase constante a 95 °C que os grânulos começam a se dissociar e a solubilização das moléculas de amilose se intensifica, gerando a queda de viscosidade, observada na Figura 25. A diferença entre a viscosidade máxima e mínima é chamada de *breakdown*, que representa a resistência do amido a agitação mecânica, onde é possível avaliar a estabilidade do amido a altas temperaturas (BELLO-PÉREZ, GARCÍA-SUÁREZ *ET AL.*, 2006). O *breakdown*, para as farinhas crua *in natura*, foram maiores que para as farinhas congeladas, na qual o processo de congelamento favoreceu o rompimento dos grânulos internos do amido da farinha de pinhão.

Para este trabalho não houve tratamento químico utilizado nas farinhas, nem separação de amido. A intenção é preservar as características da farinha levando até o produto final, além de gerar economia e tempo de processo. A pasta do amido de pinhão mostra um

viscoamilograma que não é usual de um cereal, nem de tubérculos, estando mais próximo de amido de leguminosas (WOSIACKI & CEREDA, 1985).

Com o objetivo de se verificar o processo qualitativo de hidrólise enzimática através de um viscoamilograma, adicionou-se pequenas quantidade de farinha de cevada maltada em farinhas de pinhões *in natura* congeladas. O acompanhamento destes perfis foram obtidos pela Figura 26 apresentando o viscoamilograma das farinhas de pinhão *in natura* congelada nº 1 e 2 e farinha de pinhão *in natura* congelada com adição de cevada maltada nº 3 e 4, sendo os valores de pico, temperatura do pico, trough, breakdown, viscosidade final e setback, apresentados na Tabela 16.

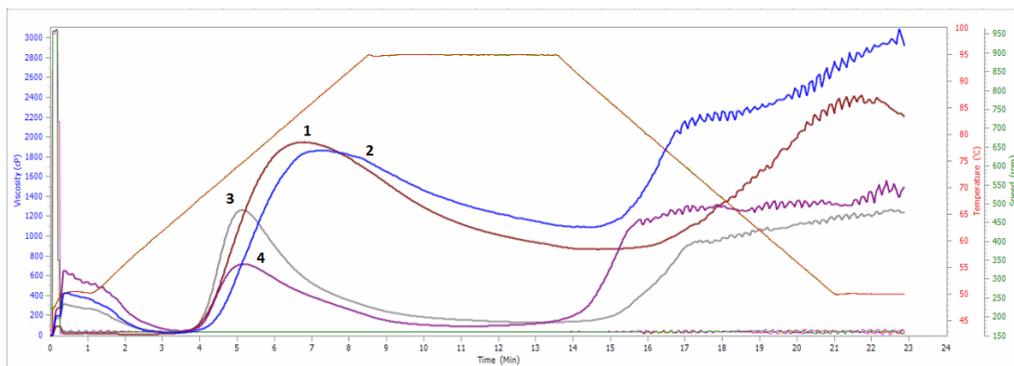


Figura 26. Viscoamilogramas das farinhas. 1 e 2 - Farinha de pinhão *in natura* congelada; 3 e 4- Farinha de pinhão *in natura* congelada (99 g/100g) + cevada maltada (1 g/100g).

Tabela 16. Comparação entre os perfis dos viscoamilogramas das farinhas de pinhão *in natura* congelada e farinhas de pinhão *in natura* congelada com adição de cevada maltada, determinado neste trabalho.

Amostras	Pico de Viscosidade (cP)	Temperatura de Pico (°C)	Trough (cP)	Breakdown (cP)	Viscosidade Final (cP)	Setback (cP)	Tempo Pico (min)
1	1949	84	865	1084	2207	1342	6,80
2	1866	88	1086	780	3074	1988	7,13
3	1265	75	127	1138	1245	1118	5,13
4	717	75	119	598	1392	1273	5,20

1 e 2 Farinha de pinhão *in natura* congelada

3 e 4 Farinha de pinhão *in natura* congelada + farinha de cevada maltada

No viscoamilograma da Figura 26, pôde-se verificar a contribuição enzimática com redução de temperatura de pasta e viscosidade das farinhas de pinhão. As amostras 1 e 2, são as farinhas *in natura* congelada, com picos de temperaturas 84 e 88 °C e picos de viscosidade de 1949 e 1866 (cP), respectivamente. A diminuição de viscosidade das amostras 3 e 4 (Tabela 16), é causada pela adição de cevada maltada, ocorrendo assim o processo de hidrólise. A diminuição dos picos de viscosidade e temperatura, podem ser explicados pelo rompimento da estrutura dos grânulos de amido durante o processo de hidrólise o que afeta a sua capacidade de inchar em água quente, resultando em uma viscosidade reduzida.

Segundo (MENEGASSI, LEONEL *ET AL.*, 2007) as condições severas térmicas usadas no processo, destroem as estruturas cristalinas do amido resultando em uma ausência ou diminuição do pico de viscosidade. Para as farinhas de pinhão *in natura* congeladas com adição de farinha de cevada maltada, esta acelerou o processo de empastamento, com menor pico de gelatinização e temperatura na faixa de 73-75 °C.

Como pode ser visualizado na Figura 26 e mensurado pela Tabela 16, as pastas das farinhas de pinhão *in natura* congelada e com adição de farinha de cevada maltada, estas apresentaram valores de viscosidade diferentes, pois o processo de hidrólise enzimática favoreceu a fluidez. Resultados similares aos encontrados por (SANDHU, SINGH *ET AL.*, 2007) que relataram que para diferentes espécies de amido de milho modificados (hidrólise ácida), houve uma queda nos valores de viscosidade inicial, viscosidade final e setback, quando comparado ao amido nativo. Sendo esta diminuição atribuída à redução de cadeias carbônicas que compõem o amido.

### 5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 27, demonstra as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de farinha de pinhão, com aumento de 750 x 1000 x. A morfologia dos grânulos de amido, semelhante à farinha de mandioca (RAMÍREZ, MUNIZ *ET AL.*, 2010; WU, 2014; PEREIRA, AQUINO *ET AL.*, 2016), pode se caracterizar pelas geometrias globulares e o formato de cabeça de cogumelo. O tamanho característico (diâmetro médio) está na faixa de 7-20 µm. De acordo com (STAHL, LOBATO *ET AL.*, 2007; COSTA, LEIVAS *ET AL.*, 2013) os grânulos de amido de milho estão entre 15 µm, trigo entre 20-22 µm e arroz entre 5 µm. Pode-se observar que os grânulos são lisos sem

apresentar irregularidades ou porosidade superficial, mas ainda é possível visualizar proteínas aderidas aos grãos, devido ao não tratamento da farinha (Figura 27, A e B). Para a farinha de pinhão pre-gelatinizada (Figura 27, C), é possível verificar que quase nenhum grão permanece após o processo térmico de pré-gelatinização, com destruição dos grânulos de amido. Esta estrutura amorfa se assemelha a esferulitas (SINGH, LELANE *ET AL.*, 2010).

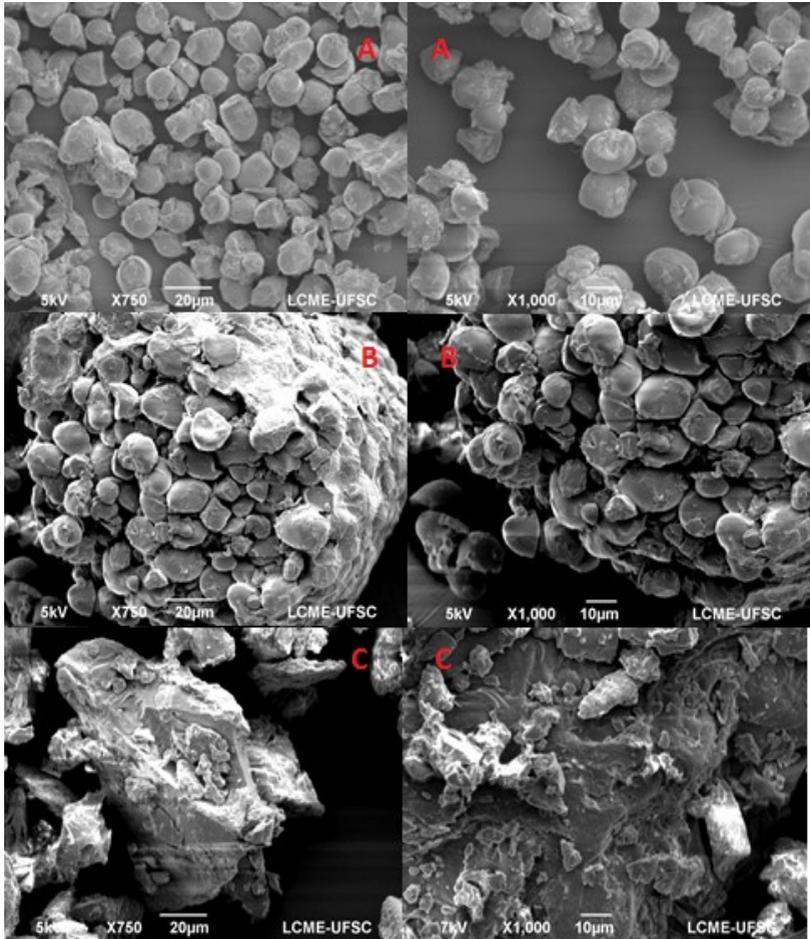


Figura 27. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das farinhas de pinhão. A- Pinhão in natura (CRU); B- Pinhão congelado; C- Pinhão pre-gelatinizado.

## 5.4 Mosto Congresso

Este processo é um indicador do potencial de fermentação, sendo que uma baixa extração dos sólidos solúveis (carboidratos e proteínas) prejudicará no rendimento, comprometendo o processo fermentativo (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004; KUNZE, 2014). A Figura 28 apresenta os resultados do processo de sacarificação do mosto congresso.

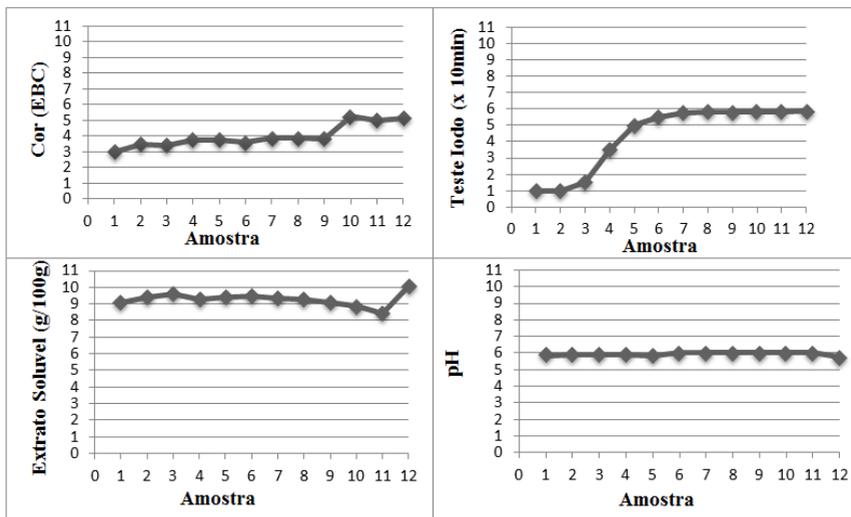


Figura 28. Método de mosto congresso para diferentes g/100g das farinhas de cevada maltada e pinhão pré-gelatinizado, com as determinações de cor, extrato solúvel (g/100g, °P), pH e teste de iodo. Amostras 1: 100 g/100g (cevada maltada); 2: 90-10 g/100g; 3: 80-20 g/100g; 4: 70-30 g/100g; 5: 60-40 g/100g; 6: 55-45 g/100g; 7: 50-50 g/100g; 8: 40-60 g/100g; 9: 30-70 g/100g; 10: 20-80 g/100g; 11: 10-90 g/100g; 12: 100 g/100g (pinhão pré-gelatinizado) com enzimas.

Conforme se aumenta a proporção da farinha de pinhão pré-gelatinizada em relação a farinha de cevada maltada, aumenta a extração de extrato solúvel no processo de mosturação com ponto máximo na proporção (80-20 g/100g) com 9,6 °P. Nesta proporção o tempo de sacarificação enzimática ainda é relativamente rápido (15 minutos) com excelente conversão, faixa de pH de 5,88 e sem promover mudanças significativas de cor no produto final com 3,4 EBC (cor do malte Pilsen, 3,0 EBC).

Apesar de o aumento na proporção de farinha de pinhão não ocasionar mudanças significativas de pH, esta provoca lentidão do processo de sacarificação (conversão enzimática) devido à quantidade e na diminuição da cevada maltada (enzimas), resultando em longos tempos de processo (35 até 60 minutos). Esta diminuição de cevada maltada influencia diretamente na hidrólise, ou seja, na extração de sólidos solúveis, aumentando assim o teor de sólidos não solúveis (amido e dextrinas de alta massa molecular).

Com a diminuição na proporção de cevada maltada, problemas de filtração da cerveja são mais pronunciados, o mesmo acontecendo em cervejas onde se utiliza o trigo. O alto conteúdo de arabinosilanas (moléculas de alto peso molecular) e a ausência de cascas (elemento filtrante) acarreta em lentidão no processo de filtração, com perdas de rendimento (BRIGGS, BOULTON *ET AL.*, 2004).

A partir da proporção (70-30 g/100g), há uma diminuição na obtenção de extrato solúvel com decaimento de graus Plato (°P), ou seja, ocorre um decréscimo de açúcares solúveis (perda de rendimento), e portanto fermentáveis, terminando em 8,4 °P para a proporção (10-90 g/100g). Este fato é físico-quimicamente preocupante, como turvações a frio *chill haze*.

Durante o acompanhamento de todo o processo, a cor do mosto praticamente não se altera, ficando na faixa de 3 EBC para quantidades de farinha de pinhão até 70 g/100g, e um máximo de 5 EBC com 100 g/100g de farinha de pinhão.

No processo do acompanhamento do teste de iodo, etapa na qual nos possibilita a verificação do momento de conversão enzimática (tempo de reação e o momento da completa sacarificação), para os três primeiros pontos onde a proporção de cevada maltada ainda é alta (100 até 80 g/100g), o tempo de sacarificação é bem rápido com tempos de 10 e 15 minutos (KUNZE, 2014). A partir deste ponto, ocorre um significativo aumento no tempo de processo, chegando até 60 minutos.

## 5.5 Quantidade de Malte Equivalente (MeV)

Com o propósito de verificar o teor médio de sólidos solúveis para a farinha de pinhão pre-gelatinizada com adição de enzimas, obteve-se um teor médio de sólidos solúveis correspondente a 10 °P contra 9 °P de cevada maltada, Figura 28. Isso gerou uma quantia equivalente a cevada maltada de 90,35 kg para a farinha de pinhão pre-gelatinizada. Isto equivale à mesma gravidade em °P de uma massa de 100 kg de cevada maltada. A Tabela 17, aponta algumas referências

bibliográficas em relação a quantidade de malte equivalente de alguns cereais utilizados nas cervejarias.

Tabela 17. MeV para diferentes adjuntos utilizados em cervejarias.

	Cevada Maltada	Malte de Trigo	Cevada	Grits de Milho	Grits de Arroz	Farinha de Pinhão pré-gel*
1	3-5	3-5	12-14	12-13	12-13	8,6
2	100 kg	100 kg	125 kg	98 kg	95-98 kg	90,35 kg

1 Teor de água nos adjuntos cervejeiros em % (os valores são uma média padrão)

2 Valor equivalente de malte (MeV), é a massa necessária, em Kg de adjunto, que fornecerá equivalente quantidade em extrato, quando comparado com 100 Kg de malte de cevada. \* Obtido neste trabalho.

Isto demonstra que a farinha de pinhão pre gelatinizada é economicamente interessante para ser utilizada como adjunto, fornecendo quantidade equivalente em extrato além de proporcionar características intrínsecas ao produto final. Confeccionou-se também a Tabela 18, afim de se comparar a farinha de pinhão com o malte de cevada, através da metodologia de mostro congresso.

Tabela 18. Comparação entre as farinhas puras, utilizando a metodologia de mosto congresso, entre Cevada maltada e pinhão pre-gelatinizado.

Parâmetros médio (mosto congresso)	Cevada maltada	Pinhão gelatinizado*	pré
Teste iodo	10 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	<<10 <sup>b</sup>	
Cor (EBC)	3,45 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	5,12 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	
°P	9,0 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	10,0 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	
pH	5,9 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	
Rendimento amostra (g/100g)	80,77 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	82,46 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	
Rendimento, base seca (g/100g)	86,67 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	90,22 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	

\*Com enzimas. A média  $\pm$  desvio padrão seguida da letra igual no mesmo arquivo não apresenta diferença significativa pelo teste de Tukey (p <0,05).

A coloração da farinha de pinhão pre gelatinizada foi 5,12 EBC, atribuído pelo cozimento com as cascas externas. Essa coloração está diretamente ligada ao processo de transferência de taninos, proporcionando aromas e sabores característicos para a semente. Um

fator muito importante para adjuntos de fontes amilácea que, quando inseridos para produção de cervejas, podem afetar de forma significativa o pH de mosturação. O aumento de adjuntos leva a uma diminuição na capacidade tamponante (fosfatos) da cevada maltada, aumentando assim o valor de pH de mosturação (PRIEST & STEWART, 2006). Como consequência a esta baixa capacidade tamponante proporcionada pelos adjuntos, isto leva a uma grande diminuição do pH durante a fase de fermentação. Esta redução nos valores de pH devido ao incremento de proporções de adjuntos na mosturação, é associado a pHs menores em cervejas jovens levando assim a maiores teores de VDK's totais (pentanodiona e butanodiona), ocasionando maiores tempos de maturação (ANNEMULLER & MANGER, 2013). Neste trabalho, o pH das diferentes proporções de cevada maltada e farinha de pinhão pre gelatinizada, ficaram numa faixa de 5,78-5,89, patamar satisfatório, visto que um pH ideal seria na faixa de 5,2-5,6 (KUNZE, 2014). A farinha de pinhão possui uma boa capacidade tamponante em sua composição, não prejudicando o pH no processo de mosturação.

#### 5.6 Rendimento da farinha de pinhão pre-gelatinizado

O teor de extrato foi influenciado pelas diferentes proporções de farinha de pinhão inserida. O extrato é um dos mais importantes fatores de caracterização de rendimento do malte de cevada e das proporções malte/pinhão, estudadas neste trabalho. Estas determinações foram listadas na Figura 29.

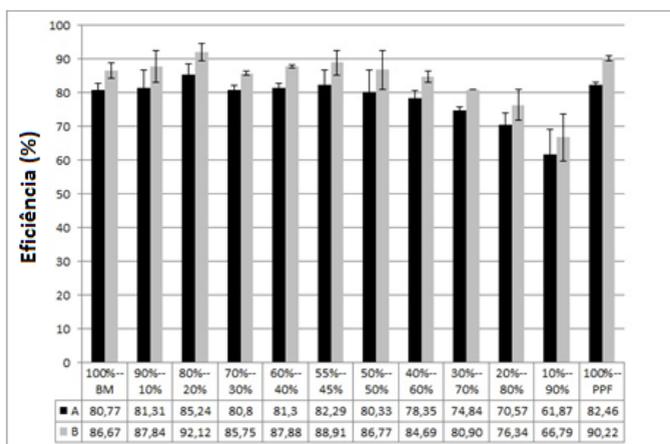


Figura 29. Média dos rendimentos das amostras (quadrado preto), e média dos rendimentos em base seca (quadrado cinza), das proporções entre cevada maltada e pinhão (GEL), técnica EBC (4.5.1). Amostras 1: 100 g/100g CM (cevada maltada); 2: 90-10 g/100g; 3: 80-20 g/100g; 4: 70-30 g/100g; 5: 60-40 g/100g; 6: 55-45 g/100g; 7: 50-50 g/100g; 8: 40-60 g/100g; 9: 30-70 g/100g; 10: 20-80 g/100g; 11: 10-90 g/100g; 12: 100 g/100g PPF (pinhão pré-gelatinizado) com enzimas.

Os valores médios de referência segundo a metodologia (metodologia EBC 4.5.1, European Brewery Convention) para a cevada maltada estão na faixa de 79-82 g/100g em base seca e para adjuntos 68-82 g/100g. Neste trabalho a média encontrada para 100 g/100g cevada maltada foi de 86,67 g/100g e para 100 g/100g pinhão pre gelatinizado, com uso de enzimas foi de 90,22 g/100g.

Para o presente estudo, sugerimos uma substituição do adjunto numa proporção de 20 g/100g. Essa proporção de adjunto cervejeiro irá aumentar o extrato solúvel, não promovendo significativas alterações nos parâmetros físico-químicos, como: variações bruscas de pH, cor, aroma, tempo de conversão enzimática, viscosidade e tempo de filtrabilidade. Para as cervejas produzidas neste trabalho, objetivou-se homogeneizar as formulações tendo e vista as possíveis diferenciações nos extratos. Segundo a classificação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (M.A.P.A), com a instrução normativa nº 54 de 05/11/2001, as cervejas foram classificadas em: (0 % pinhão em

cerveja leve puro malte, 20 g/100g cerveja com pinhão e 50 g/100g em cerveja leve de pinhão). A Tabela 19 demonstra essas atribuições que advem advém de valores obtidos nos extratos aparente, primitivo e real.

Tabela 19. Classificação das cervejas produzidas neste trabalho.

Classificação	Cervejas (formulações)		
	0g/100g pinhão	20g/100g pinhão	50g/100g pinhão
M.A.P.A	Cerveja leve puro malte	Cerveja com pinhão	Cerveja leve de pinhão*
Ea (°P)	2,36	2,36	2,62
Er (°P)	4,02	4,29	4,29
Ep (°P)	10,25	11,29	10,28
EBC (cor)	5,8	6,3	6,9
Álcool teórico (% v/v)	3,86	4,36	3,73

\*Nome fictício. Segundo a classificação do M.A.P.A 54 de 05/11/2001, não existe cerveja com teor de adjuntos maior que 45 % em massa.

Com objetivo de se verificar a qualidade das conversões enzimáticas para as formulações de 0, 20 e 50 g/100g de farinha de pinhão, determinou-se a quantidade de amido total restante no resíduo de malte (bagaço de malte). Após o processo de mosturação, coletou-se uma fração do resíduo levando a secagem. Para determinação do amido total, a metodologia de secagem e composição centesimal do amido, foram as mesmas já descritas neste trabalho. Os resultados estão ilustrados na Tabela 20.

Tabela 20. Quantidade de amido total restante no resíduo de malte, das seguintes proporções entre farinha de cevada maltada e pinhão pre gelatinizado:

Amido Total	(g/100g)
100 g/100g Cevada Maltada	21,89
80-20 g/100g Pinhão pre gelatinizado	26,30
50-50 g/100g Pinhão pre gelatinizado	32,72

Segundo (BAMFORTH, CHARLES W., 2003) para uma tradicional mosturação, a fermentabilidade máxima normalmente alcançado é de cerca de 70-80 g/100g. Diante disso, as formulações para 100 g/100g de cevada maltada e 20 g/100g de farinha de pinhão, obtiveram 78,11 e 73,7 g/100g de extrato solúvel, ficando dentro dos parâmetros. Já para a composição de 50 g/100g de farinha de pinhão, a fermentabilidade diminui para 67,28 g/100g, ficando semelhante a uma fermentabilidade de malte colorido.

## 6. FERMENTAÇÃO

### 6.1 Perfil físico-químico

Nesta segunda etapa do presente trabalho foram confeccionadas três diferentes cervejas, a fim de se verificar o perfil físico-eletroquímico (fase fermentativa) e o perfil aromático das cervejas (CG-MS) elaboradas com 0, 20 e 50 g/100g de farinha de pinhão pré-gelatinizado. Adotou-se a correlação entre os números de coletas tomados com tempo de fermentação, conforme demonstra o Quadro 6.

Quadro 6. Correlação dos números de amostras coletadas com o tempo em horas

Numero da Coleta	Tempo (horas)
1	1
2	6
3	19
4	24
5	29
6	44
7	48
8	54
9	70
10	77
11	94
12	116
13	121
14	146

A representação gráfica da contagem celular em relação ao tempo de fermentação, Figura 30-a, demonstra o desenvolvimento da multiplicação celular das leveduras conforme o tempo (*Saccharomyces cerevisiae*, tipo ale “American Ale”, bio4<sup>®</sup>) em diferentes composições de mosto cervejeiro e a Figura 30-b, demonstra o decaimento das densidades específicas obtidas com o tempo de fermentação.

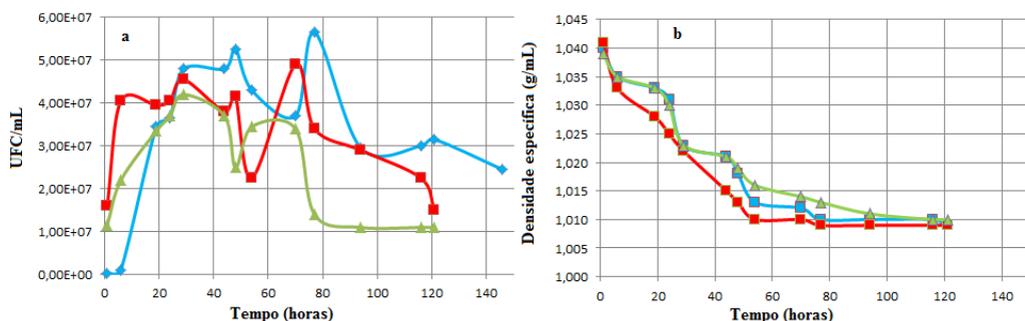


Figura 30. a- representação gráfica da multiplicação celular das leveduras (UFC/mL) perante as diferentes composições de cevada maltada e farinha de pinhão (0, 20 e 50 g/100g). b- representação gráfica do decaimento da densidade específica (g/mL) obtida a partir das diferentes composições de cevada maltada e farinha de pinhão (0, 20 e 50 g/100g). Cor azul: 0 g/100g; Cor vermelha 20 g/100g; Cor verde 50 g/100g.

Na Figura 30-a, verifica-se que para as composições de mosto com 0 e 20 g/100g de farinha pré-gelatinizado de pinhão, não houve diferenças significativas nos perfis de crescimento celular (fermentação), nos tempos de 6 até 77 horas (coletas de 2 a 10), mesmo com a densidade específica de 20 g/100g estar maior (1,044 g/mL) em comparação a 0 g/100g (1,040 g/mL). Já para a composição com 50 g/100g de farinha de pinhão pré-gelatinizado, o perfil é menos intenso durante o crescimento celular. Certamente, neste caso a composição nutricional do mosto cervejeiro influenciou no desempenho das leveduras. De modo semelhante, estudos conduzidos por (ANNEMULLER & MANGER, 2013), relataram que para um aumento na proporção de 50 g/100g de adjuntos, neste caso a cevada, houve diminuição na composição de  $\alpha$ -amino-nitrogênio (FAN), maltose e na atenuação final do mosto.

Do ponto de vista quantitativo, carboidratos e proteínas representam os principais nutrientes utilizados pela levedura. Isto sugere que o fluxo metabólico destes nutrientes, bem como a interação entre eles se constitua num importante parâmetro de regulação do crescimento celular, produção de biomassa e na secreção de atividade amilolítica (TER SHURE, SILLJÉ *ET AL.*, 1995). No mosto cervejeiro, a principal fonte nitrogênio (proteínas) é uma mistura de aminoácidos, peptídeos e pequena quantidade de amônia. A utilização destas fonte de nitrogênio pelas leveduras só ocorrem após a hidrólise (PRIEST & STEWART, 2006).

Está claro que a composição centesimal dos adjuntos mais especificamente o teor de FAN, influencia efetivamente o estado fisiológico das leveduras. Nas Tabelas 13 e 14, podemos comparar os teores de proteínas (possíveis geradores de FAN) dentre os adjuntos mais utilizados nas indústrias cervejeiras mundiais e a farinha da semente de pinhão. A quantidade de proteína para a farinha de pinhão, está entre 5-6 g/100g, enquanto o milho, cevada e trigo, possuem praticamente o dobro. Diante disso é plausível considerar que a composição de compostos nitrogenados (FAN), para a composição de 50 g/100g em farinha de pinhão, encontra-se deficiente. Para ajudar a esclarecer isso, (ANNEMULLER & MANGER, 2013) analisaram a composição de FAN de um mosto com 100 g/100g de cevada maltada, obtendo um total >200 mg FAN/L. Sendo esta uma composição ideal (mosto de 12 °P), para a composição nutricional para as leveduras. De outra forma, quando adjuntos são parcialmente substituídos por cevada maltada, a composição de FAN no mosto cervejeiro altera-se

significativamente. Estudos feitos com variadas proporções de adjuntos cervejeiros e cevada maltada, (20–80 g/100g, respectivamente): sendo estes o milho e o arroz, mostraram um decaimento de 20 g/100g no teor de FAN para o mosto cervejeiro (160 mg FAN/L).

Para proporções com  $\geq 50$  g/100g de adjuntos, (PIERCE, 1987; ANNEMULLER & MANGER, 2013) indicam algumas estratégias tecnológicas para minimizar estes problemas como: utilização de cevada maltada com alto nível Kolbach Index (44-46 g/100g), longo tempo de parada proteica (30-60 minutos) entre 40-50 °C e utilização de proteases.

A Figura 31, ilustra o grau de fermentabilidade (atenuação aparente, em %) das leveduras ao longo de todo o processo fermentativo. A proporção de 50 g/100g de farinha de pinhão pré-gelatinizado obteve o menor valor entre os 3 mostos cervejeiros, com 74,76 %. Com os parâmetros da referência EBC 4.11.1, as proporções 0 e 20 g/100g ficaram com alta taxa de fermentabilidade 77,23 e 79,30 % respectivamente, enquanto a proporção de 50 g/100g ficou com taxa média de fermentabilidade.

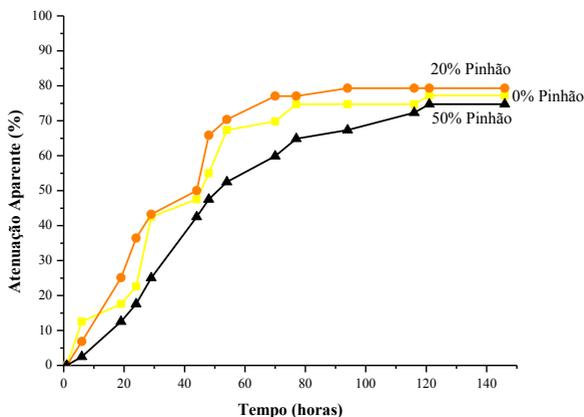


Figura 31. Representação gráfica da atenuação aparente (%), para as diferentes composições de mosto cervejeiro, utilizando farinha pre-gelatinizada de pinhão. (Valores de referência: 65-70 % Baixa; 71-75 % Média; 76-85 % Alta). EBC 4.11.1.

## 6.2 Perfil eletroquímico (redox) e aromáticos

O processo fermentativo da cerveja é constituído de microrganismos, macronutrientes, aqui representado por elementos químicos, (C, H, O, N, S, etc.), micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Ca, Mg, Cl<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, etc.), vitaminas e, em sua maior composição, a água, de 90 a 95 % (BAMFORTH, C. W., 2003), caracterizando-se assim, como um sistema aquoso.

O estudo dos potenciais de oxido-redução é uma importante ferramenta de investigação do comportamento redox (Eh, mV) de substâncias envolvidas no processo de fermentação na cerveja, devido ao balanço de cargas positivas e negativas no sistema aquoso (LIU, LUI *ET AL.*, 2015). Potencial redox quantifica momentaneamente a atividade biológica, podendo o meio estar ora no campo oxidante ora no campo redutor. Uma substância com potencial redox alto, tem caráter oxidante com forte tendência em perder elétrons (campo redox com ausência de elétrons), enquanto que outra substância com potencial redox baixo, apresenta caráter redutor, tem forte tendência a aceitar elétrons (campo redox com presença de elétrons) (LIU, LIN&BAI, 2011a).

Durante a fermentação o maior contribuidor para as mudanças do potencial redox são NADH (atuando como doadores de elétrons) na formação de biomassa e consumo de glicose, por outro lado, o oxigênio dissolvido é utilizado para a reprodução celular, sendo este o elemento principal para as trocas extracelulares (atua como aceptores de elétrons), tornando o meio oxidante. Estas mudanças no potencial redox em processos fermentativos estão relacionadas com intensas atividades celulares (LIU, LIN&BAI, 2011b).

A partir disso, a leitura do potencial redox permite por exemplo, manipular e controlar parâmetros quando estamos trabalhando com organismos vivos (leveduras, do tipo *Saccharomyces cerevisiae*) em ambiente anaeróbio (LIN, CHIEN *ET AL.*, 2010).

Postula-se que a produção de glicerol pelas leveduras para manutenção do equilíbrio redox na célula, esteja relacionada prioritariamente com distúrbios fisiológicos decorrentes de uma inadequação do meio fermentativo do que com necessidades metabólicas da levedura (ALVES, 1994).

O equilíbrio redox celular é alterado em anaerobiose, em pesquisas com produção de etanol a partir de mostos com alta densidade específica, os autores (LIN, CHIEN *ET AL.*, 2010; LIU, LIN&BAI, 2011a) observaram que ao manipular os potenciais de oxidorredução, fixando-os em potenciais negativos, havia alterações também na

eficiência da fermentação, produção de etanol e viabilidade das leveduras. Já (LIU, LIN&BAIA, 2011) detectaram que alterando os potenciais redox, isso era refletido no estado momentâneo fisiológico dos microrganismos e assim controlava-se a distribuição dos fluxos metabólicos intracelulares a favor da formação de metabólicos desejáveis, no caso, a produção de etanol.

Com a ideia de ser verificar o comportamento redox com diferentes composições de mosto cervejeiro neste trabalho, confeccionou-se as Figuras 32 e 33. Elas correlacionam o desenvolvimento do crescimento celular (Figura 32) e o decaimento da densidade específica (Figura 33) em função dos potenciais de oxidorredução, conforme o tempo de fermentação anaeróbica.

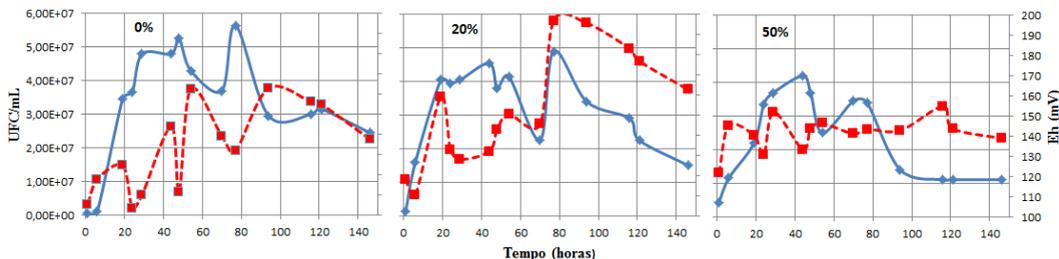


Figura 32. Representação gráfica do crescimento celular (linha contínua azul) e potencial redox, Eh (linha pontilhada vermelho), das diferentes composições de mosto, em fase anaeróbica fermentativa.

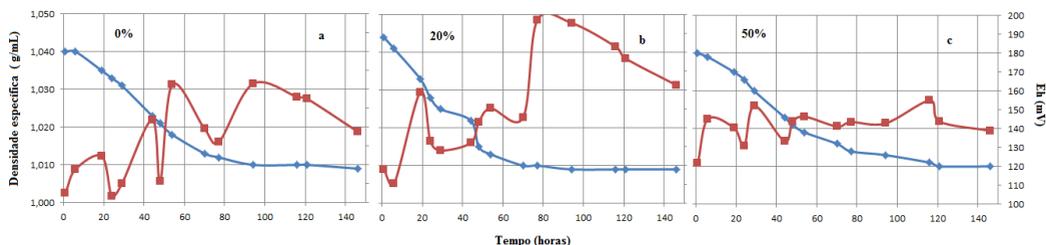


Figura 33. a-b-c. Representação gráfica da densidade específica (linha azul) e potencial redox, Eh (mV) (linha vermelha). Das diferentes composições de mosto, em fase anaeróbica fermentativa.

As medidas redox refletem o status metabólico das células de leveduras em função da fermentação. Apesar de os perfis não serem muito conclusivos, estes por sua vez, demonstram uma certa tendência. Diante disso, alguns pontos devem ser mencionados, como: a diferença na composição dos mostos cervejeiros (0, 20 e 50 g/100g), a variação da quantidade de oxigênio dissolvido, e a adaptação das leveduras para cada tipo de mosto. Estas flutuações nos potenciais redox durante a fase de fermentação, também foram relatadas por (LIU, LUI *ET AL.*, 2015) quando o objetivo era a produção de etanol.

Durante a fase inicial da fermentação, nas primeiras horas (1-6 horas), ainda percebe-se a fase *lag*, com pouco desenvolvimento celular e mínimas variações no potencial redox (100-120 mV), com leve decaimento na densidade específica (g/mL). Após a fase de adaptação as leveduras iniciam o processo fermentativo anaeróbico (fase *log*), com alta atividade celular ( $\geq 10^7$  UFC/mL) e intensa atividade redox. Esta troca da fase (*lag--log*), com aumento de atividade redox é atribuído por (LIU, LUI *ET AL.*, 2015) como uma vigorosa propagação celular e rápido consumo de oxigênio.

Isto é verificado nas Figuras 32 e 33, a partir de 6 horas de fermentação, onde os potenciais redox aumentam bastante 150, 160 e 195 mV para os mostos com 0, 50 e 20 g/100g, respectivamente.

Estudos de (LIN, CHIEN *ET AL.*, 2010; LIU, LUI *ET AL.*, 2015) correlacionaram a queda de carboidratos fermentáveis, com potenciais negativos (crescimento do estado redutor) com o crescimento celular durante o processo fermentativo. Estes ainda observaram que, a medida que diminuía o campo redox (quanto mais redutor), mais alta era a taxa de crescimento celular.

Após cessada a fase *log*, entra-se na fase estacionária, onde grande parte dos carboidratos já foram consumidos, com densidade finais entre (1,009 e 1,010 g/mL) e potenciais de 140 e 160 mV. Essa correlação acontece nos tempos de 99-115 horas, onde há estabilização dos potenciais redox e na propagação celular.

De modo geral, o perfil redox em fase fermentativa, obtido pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, pode ser generalizado por uma linha de tendência, conforme Figura 34. Essa linha de tendência sugere que, os elétrons previamente disponíveis da fase *log* (campo redutor), são utilizados pelas leveduras para formação de novos compostos, como a formação de biomassa e ácidos orgânicos. Essa utilização de elétrons disponíveis restabelece previamente, o equilíbrio redox celular durante a fermentação alcoólica, pois o crescimento celular constitui uma oxidação em termo globais (ALVES, 1994).

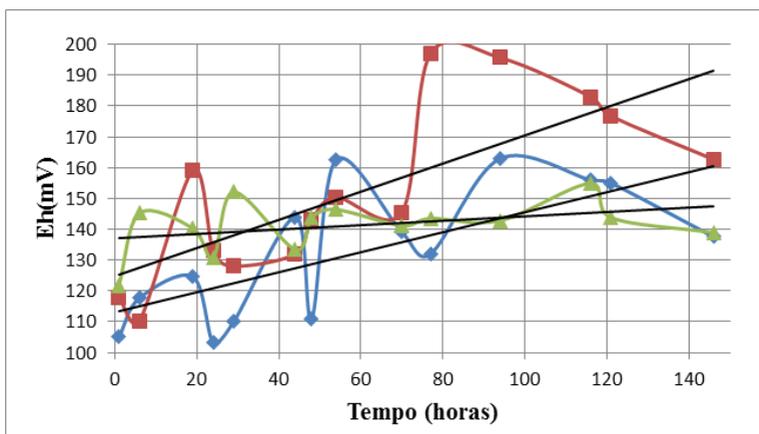


Figura 34. Representação gráfica da tendência (linha preta) do comportamento redox, Eh (mV), perante as diferentes composições de mosto cervejeiro. Linha azul (0g /100g pinhão), linha vermelha (20g /100g pinhão) e linha verde ( 50g /100g Pinhão).

Vários autores (LIU, LIN&BAI, 2011a; b; LIU, LIN&BAIA, 2011; LIU, XUE *ET AL.*, 2013; LIU, LUI *ET AL.*, 2015), têm direcionado seus estudos somente aos potenciais eletroquímicos (Eh) e suas relações com os microrganismos, em particular as leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, correlacionando assim, a produção de biomassa, a quantidade de álcool, o consumo de glicose e volumes de oxigenação.

O controle de outro parâmetro importante é o do potencial hidrogeniônico (pH), que nos informa a atividade do próton  $H^+$  no sistema (LIU, XUE *ET AL.*, 2013). O pH e o oxigênio são considerados como os principais fatores que influenciam a estabilidade organoléptica da cerveja (FRANÇOIS, GUYOT-DECLERCK *ET AL.*, 2006). Deste modo, confeccionou-se a Figura 35, de modo a acompanhar a evolução do pH durante o processo fermentativo.

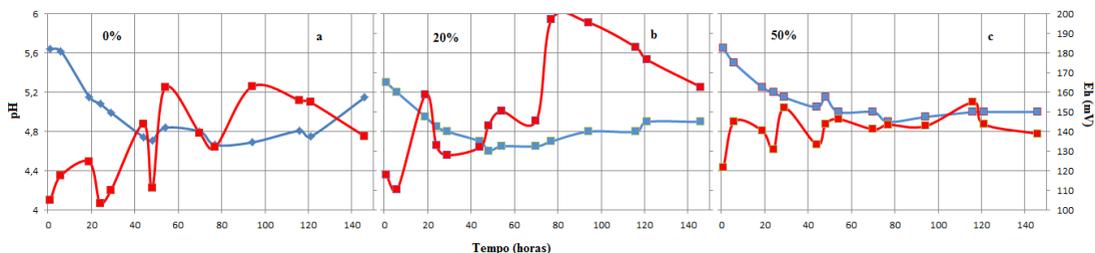


Figura 35. a-b-c. Representação gráfica do pH (linha azul) e potencial redox, Eh (mV) (linha vermelha). Das diferentes composições de mosto, em fase anaeróbica fermentativa.

Percebe-se que para as cervejas produzidas com pinhão 20 e 50 g/100g, o pH permaneceu em níveis inferiores, mas muito próximos a formulação de 0 g/100g de pinhão, com pH 5,2. Isso significa uma cerveja estável ao ponto de vista de pH, e que este novo adjunto cervejeiro, não prejudica o efeito tampão proporcionado pelo malte.

Para aprofundar as investigações confeccionou-se a Figura 36, que é o diagrama de Pourbaix. Com este diagrama pode-se verificar o comportamento biológico da levedura, diante os potenciais químico (pH) e o eletroquímico (Eh). Esta proposta de investigação baseia-se no estudo simultâneo das estabilidades termodinâmica (pH) e eletroquímica (Eh) (O'KEEKE, 2001).

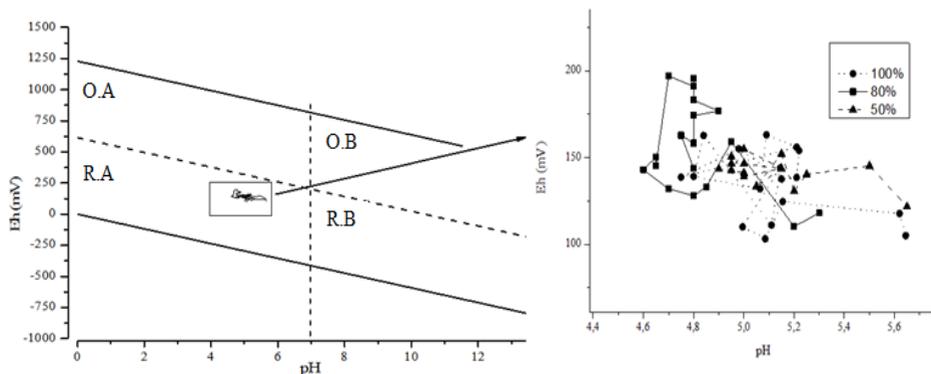


Figura 36. Diagrama de Pourbaix da cerveja à 25 °C. Divididos em 04 campos, sendo estes: O.A: oxidante ácido, O.B: oxidante básico, R.A: redutor ácido e R.B: redutor básico. A: 100 g/100g cevada maltada (linhas tracejadas com círculos); B: 80 g/100g cevada maltada (linha sólida com quadrados); C: 50 g/100g cevada maltada (linha pontilhada com triângulos).

Vale salientar que para o caso de águas naturais, sedimento e também para processos que envolvem microrganismos, o equilíbrio dificilmente é atingido, e os valores do potencial são influenciados pelos pares que estão em concentrações mais elevadas. Os valores de potencial redox medidos em sistemas naturais deverão se situar dentro dos limites mostrados no diagrama, o que possibilita apontar as espécies predominantes que devem ser encontradas na amostra investigada, muito embora nem sempre a cinética química permita que esta previsão ocorra, em especial em reações mediadas por microrganismos (JARDIM, 2014).

Ao construir a Figura 36, para as formulações produzidas neste trabalho, obtivemos uma direção ao longo de todo o processo fermentativo. O diagrama possibilita nos pre-dizer quais espécies positivas ou negativas estão atuando e sendo formadas, dependendo de seu enquadramento no diagrama. Em cada um dos quatro campos contido no diagrama, residirá espécies prevalentes que nos possibilitará indicar suas formas moleculares em termos de prótons e/ou elétrons, sendo outra técnica extremamente útil para a verificação da estrutura molecular. Neste contexto a direção obtida foi oblíqua, envolvendo

assim reações de ( $H^+$ ) quanto de ( $e^-$ ), sendo espécies predominantemente redutoras- ácidas.

Isto significa que o processo fermentativo desenvolvido pelas leveduras, além de complexo em seu metabolismo promove um campo onde elétrons estão disponíveis, determinando assim, que as moléculas estejam receptivas a outras moléculas carregadas positivamente, favorecidas pelo pH ácido. Com isso, ocorre a formação de novos compostos que determinarão o flavour do produto final.

Nesse contexto, com o objetivo de se verificar possíveis diferenças nas composições aromáticas das cervejas produzidas neste estudo, utilizou-se a cromatográfica a gás acoplado ao detector de massas. O estado redox celular, assim como temperatura, densidade e composição nutricional do mosto, pH, taxa de inóculo e linhagem, são alguns dos parâmetros que determinam o impacto sobre o metabolismo nas leveduras (VERSTREPEN, KEVIN J., DERDELINCKX, GUY *ET AL.*, 2003). Consequentemente estes fatores estão envolvidos na produção de compostos aromáticos desenvolvidos durante o processo fermentativo (VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G. *ET AL.*, 2003). De acordo com (FARINA, MEDINA *ET AL.*, 2012), existem compostos voláteis “indicadores”, na qual a formação aumenta conforme estes metabólitos ficam um maior tempo em campo redutor. A fim de se verificar possíveis diferenças nas composições aromáticas, utilizou-se o CG-MS para detectar qualitativamente compostos voláteis na água do cozimento do pinhão e nas cervejas produzidas com mostos de diferentes composições, Figura 37.

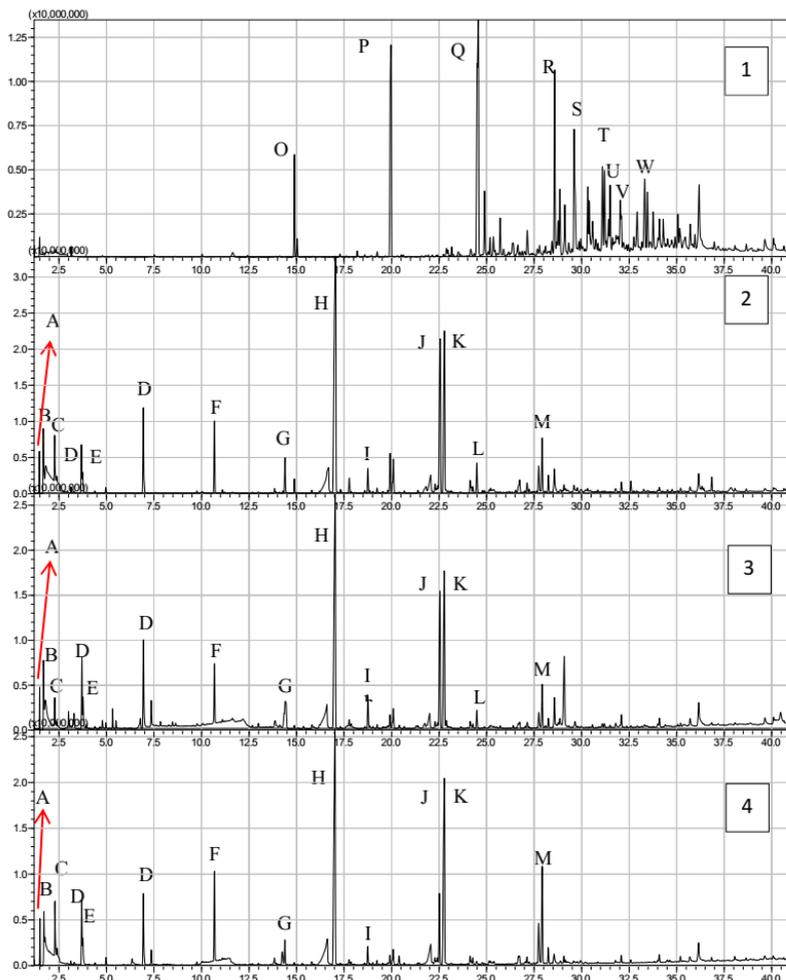


Figura 38. Perfil cromatográfico em CG-MS dos compostos voláteis na água de pinhão (1) e nas cervejas produzidas com mosto 100 g/100g cevada maltada (2), 80 g/100g cevada maltada (3) 50 g/100g cevada maltada (4). A: dióxido de carbono; B: álcool etílico; C: etil acetato; D: 3-metil-1-butanol; E: 2-metil-1-butanol; F: ácido hexanóico; G: fenil etil ester; H: ácido octanóico; I: 2-fenil-etil-ester; J: etil-9-decanoato; K: ácido decanóico; L: isopentil ester; M: ácido dodecanóico; O: nonanal; P: undecanal; Q: heneicosane; R: tetradecanal; S: 1-propil-octil benzeno; T: 1-butil-octil benzeno; U: 1-propil-nonil benzeno; V: etil decil benzeno; W: butil nonil benzeno.

A formação de compostos orgânicos ocorre em sua maioria durante a fase de fermentação sendo eles, isobutil acetato, etil acetato, isoamil acetato, etil decanoato, ácido octanóico, ácido decanóico e ácido hexanóico (FARINA, MEDINA *ET AL.*, 2012). Dentre os compostos indicadores foram encontrados quatro neste trabalho: etil acetato, ácido octanóico, ácido decanóico e ácido hexanóico. Ainda segundo os autores (FARINA, MEDINA *ET AL.*, 2012), uma forte correlação entre o estado redox em campo redutor e a produção dos compostos (2-metil-propanol, acetaldeído, ácido isovalérico, 3-metil-Tio-1-propanol, fenil-etil-álcool, 2-metil-butanol), sendo o 2-metil-butanol presentes nas 03 cervejas, estão diretamente interligados.

Assim, as variações na formação dos compostos, álcoois de cadeia longa e iso-ácidos, são afetados pelo campo redox atuante, onde essas condições estão correlacionadas com o balanço celular  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . O  $\text{NAD}^+$  é produzido na biossíntese do álcool e o  $\text{NADH}$  é oxidado durante a biossíntese dos ácidos isobutanóico e isovalérico. Sendo assim, mudanças no perfil dos aminoácidos afetará diferentes desidrogenases alterando o balanço  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , resultando assim em diferentes compostos aromáticos (FARINA, MEDINA *ET AL.*, 2012).

Os compostos voláteis obtidos foram qualitativamente semelhantes para as 03 cervejas produzidas com mostos de composição diferente. Deste modo a utilização do adjunto para confecção de cervejas tipo ales ou lagers, pode contribuir com o enriquecimento em extrato, sendo a melhor contribuição a proporção 80-20 g/100g cevada maltada e farinha de pinhão, respectivamente. Ainda comparando os cromatogramas das cervejas com a água do cozimento do pinhão, pode-se verificar que não houve contribuição de compostos aromáticos provindos da farinha, nas cervejas finais.

## 7. CONCLUSÃO

A extração da farinha de pinhão a partir de sementes sem a adição de compostos químicos provou ser simples, devido ao alto rendimento e baixa proporção de lipídios, proteínas, fibras e cinzas, sendo ideal para confecção de cervejas. As farinhas produzidas neste trabalho resultaram com teor de umidade abaixo de 15 g/100g.

A técnica de RVA demonstrou ser uma ferramenta importante para o setor cervejeiro, porém não comumente utilizada. Esta técnica permitiu a verificação do ponto de gelatinização das farinhas de pinhão elaboradas neste trabalho sem tratamento prévio (também podendo ser

utilizada para outras farinhas). O ponto forte desta técnica, quando se trata de amidos é orientar o mestre cervejeiro, sob a forma tecnológica mais eficiente para ser utilizada, tendo como base a temperatura de 78 °C. Os viscoamilogramas das farinhas de pinhão foram essenciais para essa verificação, sendo que somente a farinha de pinhão (pré-gelatinizado), poderá ser utilizada em temperatura de sacarificação juntamente com o malte base. Já as farinhas *in natura* crua e congeladas podem ser utilizadas nas mesmas construções tecnológicas direcionadas aos adjuntos de fontes amilácea (milho e arroz) sem maiores problemas.

Verificou-se que a farinha de pinhão pré-gelatinizado manteve-se estável (sem rancificação), além de fornecer cor e extrato solúvel para a produção de cerveja (6 EBC). Resultando assim em uma coloração dourada, um pouco mais escura que o do malte Pilsen (3,0 EBC). O rendimento de amido, na farinha de pinhão foi de aproximadamente 60 g/100g. Isto possibilita uma interessante fonte de extrato com melhor custo em relação à cevada maltada.

O presente estudo sugere que a melhor substituição de cevada maltada pelo pinhão pré-gelatinizado é a proporção de 20 g/100g, sem necessidade de utilização de co-adjuvantes de processo. Esta proporção de adjunto para o processo de fabricação de cerveja irá aumentar o extrato solúvel (aumento de 10 g/100g em relação à mesma quantia de cevada maltada) não promovendo diferenças físico-químicas significativas, tais como: variações súbitas de pH, cor, aroma, tempo de conversão enzimática, viscosidade e tempo de filtração. Se uma utilização maior de adjunto for desejada, é altamente recomendável utilizar enzimas para evitar perdas de rendimento e problemas tecnológicos. Recomenda-se ainda a utilização da técnica de RVA para economia de processo, rapidez e maior clareza nos resultados.

O presente estudo verificou o comportamento do potencial redox e correlacionou este com alguns parâmetros físico-químicos comumente empregados no monitoramento dos processos fermentativos para a produção de cervejas. A utilização da farinha de pinhão como adjunto cervejeiro, em diferentes proporções (80-20 g/100g e 50-50 g/100g) demonstrou-se viável em substituição parcial da cevada maltada.

Os resultados obtidos demonstraram indiretamente, sob uma nova ótica, o status metabólico das leveduras ao longo do processo fermentativo, além de boas correlações aos fatores nutricionais dos mostos. Pode-se verificar que no início do processo, durante a fase *lag*, criou-se um ambiente propício para o desenvolvimento das leveduras com nutrientes e oxigenação. Nesta fase adaptativa não existem trocas metabólicas com o meio, porém, existem pequenas variações no

potencial redox. Com o passar do tempo, iniciou-se a fase *log* mais tumultuosa da fermentação com um grande consumo de açúcares e multiplicação celular, ocorrendo conseqüentemente aumento no potencial redox, indicando assim a geração de elétrons disponíveis no meio. Na fase estacionária observou-se uma estabilização no consumo de açúcares e reprodução celular assim como o restabelecimento do potencial redox sem variações abruptas como na fase *log*.

Este estudo propôs ainda verificar o perfil aromático das cervejas elaboradas com farinha de pinhão. Os resultados obtidos utilizando a preparação das amostras usando a técnica SPME com fibra de PDMS e CG-MS indicaram que as cervejas possuem perfis qualitativos de compostos aromáticos semelhantes entre si, não havendo contribuição da farinha de pinhão para uma diferenciação sensorial do produto final.

Por outro lado, é possível utilizar a farinha de pinhão com níveis de até 50 g/100g (recomenda-se neste caso, a utilização de coadjuvantes de processo) na formulação de cervejas, na qual se deseja perfil aromático neutro. Com os resultados obtidos é possível obter o mesmo perfil sensorial de uma cerveja 100 g/100g cevada maltada. Além disso, uma vez que a farinha de pinhão foi pré-gelatinizada, não há necessidade de novas construções tecnológicas para a utilização da farinha, sendo possível utilizar diretamente no processo de mosturação.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a colaboração da professora Edna Regina Amante, da UFSC, dos laboratórios da LCME e da LABCAL, para o uso do MEV e análises químicas, respectivamente. Ao professor Eduardo Carasek, da UFSC, os laboratórios da QMC para o uso da CG-MS. Os autores agradecem às empresas Brewtime (Gabriel Gandolpho), LevTeck (Gabriela Muller) e Bio4 (Marcelo Barga)) pelo fornecimento de insumos cervejeiros e à FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) pelo apoio financeiro por meio de uma bolsa de estudos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Association of Agricultural Chemists. **Official method 985.29. Total Dietary Fiber, Enzimathic-Gravimetric Method.** First action. 2000a.

A.O.A.C. Association of Agricultural Chemists. **Official Method 996.11 Starch (Total) in Cereal Products.** 2000b.

A.S.B.C. American Society of Brewing Chemists. **Methods of Analysis, 8th ed. Barley-6 Methods of Barley Analysis.** St. Paul, MN.: American Society of Brewing Chemists 1992.

ABRACERVA. Associação Brasileira das Microcervejarias e Empresas do Setor Cervejeiro. 2018. Disponível em: < <http://abracerva.com.br/sobre/> >. Acesso em: 08 de janeiro de 2018.

ALMEIDA, U. D. **Matérias-Primas dos Alimentos.** São Paulo: Editora Blucher, 2010. ISBN 978-85-212-0529-6.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** 1994. 251 (Dissertação Mestrado). Departamento de Ciências ESALQ/USP, Piracicaba.

AMBEV. Nossa Historia: A construção de um sonho grande. 2014. Disponível em: < [www.ambev.com.br](http://www.ambev.com.br) >. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

ANNEMULLER, G.; MANGER, H.-J. **Processing of various adjuncts in beer production.** Berlin: VLB Berlin, 2013. ISBN 978-3-921690-74-1.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCMIDELL, W.; LIMA, U. D. A. **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo: Editora: Blucher, 2001. p.198

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente.** 3. ed. 2006. 968 ISBN 95-363-0668-8.

BAMFORTH, C. W. Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review. **Master Brewers Association of the Americas**, v. 40, n. 2, p. 89-97, 2003.

BAMFORTH, C. W. Chemistry of Brewing. **Beers**, p. 440-447, 2003.

BELLO-PÉREZ, L. A.; GARCÍA-SUÁREZ, F. J.; MÉNDEZ-MONTEALVO, G.; NASCIMENTO, J. R. O. D.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Isolation and Characterization of Starch from Seeds of *Araucaria brasiliensis*: A Novel Starch for Application in Food Industry. **Starch/Stärke**, v. 58, p. 283-291, 2006.

BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRI, A. L.; MAGRI, A. D.; MARINI, F. Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craftbeer aimed at its authentication. **Analytica Chimica Acta**, n. 820, p. 23-31, 2014.

BRANDÃO, G.; CARVALHO, M. D.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. D. A. E. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2ª Parte - A Fermentação **Revista Analytica**, n. 26, p. 46-54, 2007.

BRASIL. Instrução normativa nº 54 de 5 de novembro de 2001, que aprovou o regulamento Técnico Mercosul de Produtos de Cervejaria, e considerando a necessidade de estabelecer a identidade e a qualidade de produtos de cervejaria destinados ao consumo humano. 2001. Disponível em: < [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br) >. Acesso em: 20 de Abril de 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o “Regulamento Técnico para Produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos”. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 263, 22/09/2005. Brasília-DF: Diário Oficial da União 2005. Disponível em: < [www.saude.rj.gov.br](http://www.saude.rj.gov.br) >. Acesso em: 2 de Maio de 2018.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Brasília: Diário Oficial da União. Instrução

Normativa N°06, de 23 de Setembro 2008. Disponível em: < [www.mma.gov.br](http://www.mma.gov.br) >. Acesso em: 13 de Maio de 2018.

BRASIL. DECRETO N° 6.871, DE 4 DE JUNHO 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas., Brasília, 2009a. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm) >. Acesso em: 28 de julho de 2018.

BRASIL. Portaria MS N° 2914 de 12/12/2011. Dispoe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2011. 2011. Disponível em: < [www.saude.mg.gov.br](http://www.saude.mg.gov.br) >. Acesso em: 09 de Maio de 2018.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and practice**. New York: Woodhead Publishing Limited, 2004. 863 ISBN 0-8493-2547-1.

BUIATTI, S. Beer Composition: An Overview. In: (Ed.). **Beer in Health and Disease Prevention**. Udine, 2009. p.213- 225. ISBN 978-0-12-373891-2.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso-alfa-acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Food Science and Technology**, n. 26, p. 21-30, 2012.

CAPELLA, A. C. D. V. Farinha de pinhão (*Araucária Angustifolia*): Composição e estabilidade do gel. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos UFPR, Curitiba-pr. p.75, 2008.

CAPELLA, A. C. V.; PENTEADO, P. T. P. S.; BALBI, M. E. Semente de *Araucaria angustifolia* : Aspectos morfológicos e composição química da farinha. **Boletim CEPPA**, n. 27, p. 135-142, 2009.

CARVALHO, G. B. M. D. Obtenção de Cerveja usando Banana como Adjunto e Aromatizante. Tese de Doutorado apresentado à Universidade de São Paulo Lorena-SP. p 163. 2009.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria Cervejeira. **Anuário 2016**. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, 2016. Disponível em: < [www.cervbrasil.org.br](http://www.cervbrasil.org.br) >. Acesso em: 11 de Junho de 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Pinhão (semente). 2014. Disponível em:<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_09\\_09\\_12\\_36\\_06\\_pinhaosementesetembro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_09_12_36_06_pinhaosementesetembro_2014.pdf)>. Acesso em: 03 de agosto de 2018.

CONFORTI, P.; LUPANO, C. E. Comparative study of the Starch digestibility of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seed flour. **Starch/Stärke**, n. 60, p. 192-198, 2008.

COSTA, F. J. O. G. D.; LEIVAS, C. L.; WASZCZYNSKYJ, N.; GODOI, R. C. B. D.; HELM, C. V.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, n. 565, p. 172-177, 2013.

DAUDT, R. M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVERA, F.; THYS, R. C. S.; MARCZAK, L. D. F. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420-429, 2014.

E.B.C. European Brewery Convention. pH of Wort. 1999. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=179> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Extract of Malt: Congress Mash. 2004a. Disponível em: <<http://www.analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=297>>. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Original, Real and Apparent Extract and Original Gravity of Beer. 2004b. Disponível em: <

<http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=469> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. pH of Beer. 2004c. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=475> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Specific gravity of wort using a density meter. 2004d. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=71> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Decarbonation of Beer. 2007. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=461> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Haemocytometry. 2011a. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=122> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Methylene Blue/Violet Stain. 2011b. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=126> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Photometric determination. 2011c. Disponível em: < <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=190> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

E.B.C. European Brewery Convention. Real Degree of Fermentation of Beer. 1997. Disponível em: < <http://www.analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=468> >. Acesso em: 03 de Junho de 2018.

EIRA, M. T. S.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R. D.; CARRARA, D. K.; MELLO, C. M. C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE. -

Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A cevada com boas perspectivas nesta safra. Disponível em <www.embrapa.br>. Acesso em 02 de Agosto de 2018.

ESSLINGER, H. M.; NARZISS, L. **Beer**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Freiburger Brauhaus Aktiengesellschaft, p. 1-44, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization. Databook on endangered tree and shrub species and provenances 524P., R. F.: **Forestry Paper**, 77. 1986.

FARINA, L.; MEDINA, K.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. Redox effect on volatile compound formation in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food chemistry**, v. 134 p. 933-939. 2012.

FERREIRA, R. H.; VASCONCELOS, M. C. R. L.; JUDICE, V. M. M.; NEVES, J. T. D. R. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte **Perspectivas em Ciência da Informação**. v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

FRANÇOIS, N.; GUYOT-DECLERCK, C.; HUG, B.; CALLEMIEN, D.; GOVAERTS, B.; COLLIN, S. Beer astringency assessed by time–intensity and quantitative descriptive analysis: Influence of pH and accelerated aging. **Food Quality and Preference**, v. 17, p. 445-452, 2006.

GUARDA, R. Possibilidades do uso do pinhão. **Revista da PUC-RS**. p. 21. 2006.

HAAS, J. I. **Guia de Lúpulos Barth-Haas**. Um guia sobre as variedade de lúpulos e seus produtos. Washington, p.178. 2013.

HIERONYMUS, S. **For the Love of Hops: The practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops** Colorado: 2012. ISBN 1938469011.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 018/IV Resíduo por incineração – Cinzas, 3. ed. São Paulo: IMESP. p. 105. 1985a.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 034/IV Lipídios ou extrato etéreo com hidrólise ácida prévia – Método B, 3. ed. São Paulo: IMESP. p. 120. 1985b.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 036/IV Protídios – Método de Kjeldahl clássico, 3. ed. São Paulo: IMESP. p. 123. 1985c.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 414/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de umidade a 105°C, 3. ed. São Paulo: IMESP. p. 98. 1985d.

JAKITAS, R. Cerveja artesanal cai no gosto do pequeno e Brasil já conta com 1,5 mil rótulos no mercado. **Estadão**, São Paulo, 2015. Disponível em: < pme.estadao.com.br >. Acesso em: 16 de Julho de 2018.

JARDIM, W. F. Medição e Interpretação de Valores de Potenciais Redox (EH) em matrizes Ambientais. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

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

KING, B. M.; DUINEVELD, C. A. A. Changes in bitterness as beer ages naturally. **Food Quality and Preference**, n. 10, p. 315-324, 1999.

KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. D. R.; COLUSSI, R.; EVANGELHO, J. A. D.; GUTKOSKI, L. C.; DIAS, A. R. G. Effect of single and dual heat-moisture treatments on

properties of rice, cassava, and pinhao starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1578–1584, 2013.

KUHLE, A. V. D. A.; JESPERSEN, L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. **International Journal of Food Microbiology**, n. 43, p. 205-213, 1998.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 2 Edition. Berlin: VLB Berlin, 1999.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 5 edição. Berlin: Versuchs und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, 2014.

LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. **Fermented Beverage Production**. 2 edition. 2003.

LEIPER, K. A.; MIEDL, M. Chapter 4 - Colloidal stability of beer. In: CHARLES, W. B.; INGE, R.; GRAHAM STEWART - CHARLES W. BAMFORTH, I. R. e GRAHAM, S. (Ed.). **Beer**. San Diego: Academic Press, 2009. cap. 4, p.111-161. ISBN 978-0-12-669201-3.

LIN, Y.-H.; CHIEN, W.-S.; DUAN, K.-J. Correlations between reduction–oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 765-770, 2010.

LIU, C.-G.; LIN, Y.-H.; BAI, F.-W. Ageing vessel configuration for continuous redox potential-controlled very-high-gravity fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 61-66, 2011a.

LIU, C.-G.; LIN, Y.-H.; BAI, F.-W. A kinetic growth model for *Saccharomyces cerevisiae* grown under redox potential-controlled very-high-gravity environment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 63-68, 2011b.

LIU, C.-G.; LUI, L.-Y.; LIN, Y.-H.; BAI, F.-W. Kinetic modeling for Redox potential-controlled repeated batch ethanol fermentation using flocculating yeast. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1-7, 2015.

LIU, C.-G.; XUE, C.; LIN, Y.-H.; BAI, F.-W. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 257-265, 2013.

LIU, C.-G.; LIN, Y.-H.; BAIA, F.-W. Development of redox potential-controlled schemes for very-high-gravity ethanol fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 42 - 47, 2011.

MALLET, J. **Malt. A Practical Guide form Field to Brewhouse**. Colorado: Brewers Publications, 2014. ISBN 9781938469121.

MAPA. Ministério do Agricultura Pecuária e Abastecimento. Dia Internacional da Cerveja: Brasil mantém vocação para produção de bebida. 2017. Disponível em <[www.mapa.gov.br](http://www.mapa.gov.br)> Acesso em: 23 de Outubro de 2017.

MAZURS, E. G.; SCHOCH, T. J.; KITE, F. E. Graphical analysis of the Brabender viscosity curves of various starches. **Cereal Chemistry**, v. 34, n. 141, 1957.

MENEGASSI, B.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.; ZAMBELLO, S. Efeito de parâmetros de extrusão na cor e propriedades de pasta de farinha de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência Agrônoma, Lavras**, v. 31, n. 6, p. 1780-1792, 2007.

MUCCILLO, R. C. D. S. T. Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais Térmicas. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. p.156. 2009.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Campinas-SP: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP: p.113 p. 2006. Disponível em <[www.nepa.unicamp.br](http://www.nepa.unicamp.br)> Acesso em: 23 de Agosto de 2018.

O'KEEKE, T. J. Pourbaix Diagrams. In: EDITORS-IN-CHIEF: , K. H. J. B.; ROBERT, W. C.; MERTON, C. F.; BERNARD,

I.;EDWARD, J. K.;SUBHASH, M. e PATRICK, V. (Ed.). **Encyclopedia of Materials: Science and Technology** (Second Edition). Oxford: Elsevier, 2001. p.7774-7781. ISBN 978-0-08-043152-9.

PALMER, J.; HAMINSKI, C. **Water: A comprehensive guide for brewers**. Colorado: Brewers Publications, 2013. 296 ISBN 9780937381991.

PARRA, C. D. Expansão das Artesanais. 2015a. Disponível em: < <http://engarrafadormoderno.com.br> >. Acesso em: 16 de Fevereiro de 2018.

PARRA, C. D. Novas alternativas. Seja especial ou não, o consumo de cervejas cresce mesmo em período de retração da economia. **Engarrafador moderno**: Editora Aden. 253: 17 - 24 p. 2015b.

PEREIRA, J. M.; AQUINO, A. C. M. S.; OLIVEIRA, D. C.; ROCHA, G.; FRANCISCO, A.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Characteristics of cassava starch fermentation wastewater based on structural degradation of starch granules. **Ciência Rural**, v. 46, p. 732-738, 2016.

PIERCE, J. S. Horace Brown Memorial Lecture: The role of nitrogen in brewing. **Journal the Institute of Brewing**, v. 93, p. 378-381, 1987.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of brewing**. 2 edition. 2006. 829 ISBN 0-8247-2657-X.

RAMÍREZ, M. G. L.; MUNIZ, G. I. B. D.; SATYANARAYANA, K. G.; TANOBE, V.; IWAKIRI, S. Preparation and characterization of biodegradable composites based on Brazilian cassava starch, corn starch and green coconut fibers. **Revista Matéria**, v. 15, p. 330-337, 2010.

REINOLD, M. R. Microcervejarias - Observações Técnicas Relevantes. 2011a. Disponível em: < [www.cerversia.com.br](http://www.cerversia.com.br) >. Acesso em 10 junho de 2018.

REINOLD, M. R. O mercado Cervejeiro atual Potencial de Crescimento. **Revista Industria de Bebidas**. 57 2011b.

REINOLD, M. R. As Cervejas Especiais no Brasil. 2013. Disponível em: < [www.cervesia.com.br](http://www.cervesia.com.br) >. Acesso em: 25 de Fevereiro de 2018.

REINOLD, M. R. Reações enzimáticas e fisico-químicas que ocorrem durante a malteação da cevada. **Cervesia**. 2015. Disponível em: < <http://www.cervesia.com.br/malte/26-reacoes-enzimaticas-e-fisico-quimicas-que-ocorrem-durante-a-malteacao-da-cevada.html> >. Acesso em: 28 de julho de 2018.

REIS, E. D. Promoção da Sóciobiodiversidade e Segurança Alimentar e Nutricional com Geração de Renda no Planalto Catarinense. Lages-SC, 2013. Disponível em: < <http://www.cooperativaecoserra.com.br/index.php/projetos> >. Acesso em: 28 de julho de 2018.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Piracicaba. p.80. 2011.

RODOLFO, C. Sensibilidade microbiológica em cervejas. **O engarrafador moderno**: Editora Aden. nº 253. 2015.

RONALDO, M. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: 2009. ISBN 978-85-7635-394-2.

SANDHU, K. S.; SINGH, N.; LIM, S. T. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, n. 40, p. 1527-1536, 2007.

SANTOS, A. J. D.; CORSO, N. M.; MARTINS, G.; BITTENCOURT, E. Aspectos Produtivos e Comerciais do Pinhão no Estado do Paraná. **Floresta**, v. 32, n. 2, p. 163-169, 2002.

SARTORI, S. Cooperativa ECOSSERRA - Cooperativa Ecológica de Agricultores, Consumidores e Artesãos da Região Serrana. Lages, 2010. Disponível em: <  
<http://www.agroecologiaemrede.org.br/experiencias.php?experiencia=966>>. Acesso em: 28 de julho de 2018.

SENAI. Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. **Curso Técnico em Cervejaria** Vassouras, Rio de Janeiro, p.800. 2004.

SINGH, J.; LELANE, C.; STEWART, R. B.; SINGH, H. Formation of starch spherulites: role of amylose content and thermal events. **Food Chemistry**, v. 121, p. 980-989, 2010.

SLEIMAN, M.; FILHO, W. G. V.; DUCATTI, C.; NOJIMOTO, T. Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 163 -172, 2010.

SOARES, R. M. D. Caracterização Parcial de Amido em Cultivares Brasileiros de cevada ( *Hordeum vulgare* L.). Tese de Doutorado apresentado ao Departamento de Ciência de Alimentos, UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina-SC, Florianópolis. p.127. 2003.

SPADA, J. C. Uso do amido de pinhão como agente encapsulante. Tese de Doutorado apresentado ao Departamento de Pós Graduação de Engenharia Química UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.p. 147. 2011.

STAHL, J. A.; LOBATO, L. P.; BOCHI, V. C.; KUBOTA, E. H.; GUTKOSKI, L. C.; EMANUELLI, T. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **LWT**, v. 40, p. 1206 -1214, 2007.

STEWART, G. G. Biochemistry of Brewing. In: (Ed.). **Biochemistry of Foods** Third edition, 2013. cap. 7, p.291-318. ISBN 978-0-12-242352-9.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. An Introduction to Brewing Science & Technology - **Brewer's Yeast**. 1998. p.108 ISBN 0900489 13 8.

TER SHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H.; RAEVEN, L. J.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 1101-1108, 1995.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VALLE, A. D. Isolamento, identificação molecular e análise do metabolismo de leveduras extraídas de fontes vegetais par a produção de cerveja. Dissertação de Mestrado apresentado ao Coordenação do Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial Universidade Positivo, Curitiba-Pr. p. 68. 2012.

VENTURINI, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2010. ISBN 978-85-212-0492-3.

VENTURINI, W. G. **INDUSTRIA DE BEBIDAS: Inovação, Gestão e Produção**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2011. p. 536 ISBN 978-85-212-0591-3.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.-P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S.; DELVAUX, F. R. Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **YEAST. The Practical Guide to Beer Fermentation**. 2010. 304 ISBN 0-937-381-96-9.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Characterization of pinhao starch. **Starch/Stärke**, n. 37, p. 224-227, 1985.

WU, D., HAKKARAINEN, M. A closed-loop process from microwave-assisted hydrothermal degradation of starch to utilization of the obtained degradation products as starch plasticizers. **Chem. Eng.**, v. 2, p. 2172-2181, 2014.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In: (Ed.). **Beer in Health and Disease Prevention**. Freising-Weihenstephan, 2009. cap. Part I, p.1-16. ISBN 978-0-12-373891-2.

YAO, N.; WHITE, P. J.; ALAVI, S. Impact of  $\beta$ -glucan and other oat flour components on physico-chemical and sensory properties of extruded oat cereals. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 46, p. 651-660, 2011.

Z Aidul, I. S. M.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M.; YAMAUCHI, H.; NODA, T. RVA analysis of mixtures of wheat flour and potato, sweet potato, yam, and cassava starches. **Carbohydrate Polymers**, n. 69, p. 784-791, 2009.

ZECHINI, A. A. Morfometria, Produção, Fenologia e Diversidade Genética: Subsídios para conservação da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze e Coleta sustentável do Pinhão no Planalto Catarinense Tese de Doutorado apresentado ao Programa do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis-SC.p.191. 2012.