

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JULIO DE GÓES SOARES

Desenvolvimento e avaliação sensorial de cerveja utilizando castanha portuguesa  
(*Castanea sativa* Mill) como adjunto

Lorena  
2019



JULIO DE GÓES SOARES

Desenvolvimento e avaliação sensorial de cerveja utilizando castanha portuguesa  
(*Castanea sativa* Mill) como adjunto

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

Versão Original

Lorena  
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Góes Soares, Júlio

Desenvolvimento e avaliação sensorial de cerveja utilizando castanha portuguesa (*Castanea sativa* Mill) como adjunto / Júlio de Góes Soares; orientador João Batista de Almeida e Silva - Versão Original. Lorena, 2019. 111 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Castanha portuguesa. 2. Cerveja. 3. Metodologia superfície de resposta. 4. Análise sensorial. I. Título. II. Almeida e Silva, João Batista de , orient.

"Nada pode ser amado ou odiado antes de ser compreendido"

Leonardo da Vinci



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de iniciar os agradecimentos reconhecendo os esforços realizados por toda a população brasileira, em especial a do estado de São Paulo, que pelo pagamento da nossa elevada carga tributária financiam a educação pública e a pesquisa em nosso país, assim como todas as oportunidades que recebi ao longo da minha vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à FAPESP e à CAPES pelo suporte financeiro ao grupo e para realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de Lorena, em especial ao Departamento de Biotecnologia (Debiq) pela oportunidade do curso de mestrado.

Ao Professor Dr. João Batista de Almeida e Silva, pela orientação e confiança juntamente aos ensinamentos na área prática, acadêmica e de pesquisa transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao Marcelo Motta de São Bento do Sapucaí pela doação da farinha de castanha portuguesa e à Profa. Dra. Marite Dal'Osto de São Roque pelo intermédio e apoio para o desenvolvimento do trabalho. E, também às empresas Soufflet Taubaté e AmBev pelos materiais doados.

Aos professores do departamento de Biotecnologia: Profa. Dra. Maria das Graças, Prof. Dr. Ismael Mancilha, Prof. Dr. Silvio Silvério e Prof. Dr. André Ferraz que me proporcionaram aprendizado nas disciplinas cursadas na pós-graduação e contribuíram muito para minha formação. Assim como ao André Silva, Nadir, a todo pessoal da secretaria e aos funcionários do campus por todo o apoio.

Aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Rita de C. L. B. Rodrigues e Prof. Dr. Thiago R. dos S. Mathias pelas contribuições e sugestões preciosas.

Aos amigos da microcervejaria e companheiros de pesquisa: Waldir, Oreves, Yanet, Amanda, Eduardo, Guilherme, Rodrigo, Laima, Fernando, Bruna e Verenna pela amizade, pelo apoio na realização dos experimentos, pela troca de conhecimentos e pelos bons momentos.

Grande agradecimento aos meus pais Alexandre e Júlia, pois, sem eles e seu apoio e dedicação imensuráveis nada disso seria possível. E a minha namorada Heloísa pela paciência e suporte ao longo dessa etapa.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigado.



## RESUMO

SOARES, J. G. **Desenvolvimento e avaliação sensorial de cerveja utilizando castanha portuguesa (*Castanea sativa* Mill) como adjunto**. 2019. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

No Brasil a cerveja pode ser produzida com água, malte, lúpulo, fermentada pela ação de leveduras e com a adição de outras matérias-primas, denominadas adjuntos. Os adjuntos, em especial os não convencionais, podem contribuir com novos sabores e trazer regionalidade a bebida, desta forma agregando valor tanto à bebida quanto a própria matéria-prima e a comunidade produtora. A Castanha Portuguesa (*Castanea sativa* Mill) no Brasil não têm todo o seu potencial aproveitado e atualmente cerca de 60% da produção é destinada ao consumo animal. Este trabalho teve como objetivo desenvolver cervejas utilizando a castanha portuguesa como adjunto de malte em até 45% do extrato primitivo do mosto. A castanha teve a temperatura de gelificação do seu amido (69,8°C) e seu rendimento em extrato (61% em massa seca) determinados. Foram selecionados os níveis baixos, médios e altos dos fatores experimentais do delineamento composto central rotacional. As condições ótimas para o pré-tratamento da castanha portuguesa para maximizar a resposta atenuação limite do mosto (74,1 %) foram temperatura de 90°C, tempo igual a 20 min, proporção de malte de 40% m/m e proporção de água 1:1 m/m, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. Após a validação do ponto ótimo experimentalmente, duas formulações de cerveja do tipo *ale* foram elaboradas em escala laboratorial contendo 30% e 45% do extrato primitivo proveniente da castanha portuguesa. A cerveja 45% de castanha foi produzida em escala piloto (100L). A análise sensorial, tanto das cervejas elaboradas em escala laboratorial quanto piloto, demonstrou elevada aceitabilidade das cervejas inclusive quando comparada com uma amostra comercial.

Palavras-chave: Castanha portuguesa. Cerveja. Metodologia de superfície de resposta. Análise sensorial.

## ABSTRACT

SOARES, J. G. **Development and sensory analysis of beer using Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill) as adjunct.** 2019. 111 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

In Brazil, beer can be produced with water, barley malt, hops, fermented by the action of yeasts and with the addition of other raw materials, named adjuncts. Adjuncts, especially the unconventional ones, can contribute to new flavors and bring regionality to beverages, thereby adding value to the beverage, to the raw material itself and to the producers community. Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill) does not have its full potential explored in Brazil and about 60% of its production is destined to animal food nowadays. This work aimed to develop beers using sweet chestnut as adjunct in up to 45% of the primitive wort extract. The sweet chestnut starch gelatinization temperature (69,8°C) and its extract yield (61% m/m dry basis) were determined. The lower, middle and upper of the experimental factors of the central composite design were selected. The optimum conditions for the sweet chestnut pretreatment to maximize the limit attenuation response (74,1%) were 90°C, 20 min, malt ratio 40% w/w and 1:1 water ratio m/m using Response Surface Methodology. The optimum conditions were experimentally confirmed. Two laboratory-grade ale beers were formulated containing 30% and 45% of the primitive extract from sweet chestnut. The beer with the highest sweet chestnut ratio (45%) was produced on a pilot scale (100L). Sensory analysis of both laboratory and pilot-scale beers demonstrated its high acceptability even when compared to a commercial sample.

Keywords: Sweet chestnut. Beer. Response Surface Methodology. Sensory analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo resumido das principais atividades metabólicas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que influenciam a qualidade sensorial da cerveja. ....	41
Figura 2 - Diagrama de blocos do processo produtivo da cerveja com matérias-primas e principais resíduos.....	44
Figura 3 - Fluxograma das atividades desenvolvidas durante o projeto. ....	55
Figura 4 - Curva da distribuição granulométrica da farinha de castanha portuguesa de acordo com a porcentagem de matéria retida.....	68
Figura 5 - Experimentos com um único fator demonstrando o efeito da temperatura sobre o extrato da FCP (a), tempo de mosturação (b) e atenuação limite do mosto (c).....	72
Figura 6 - Experimentos com um único fator demonstrando o efeito do tempo de pré-tratamento sobre o extrato da FCP (a), tempo de mosturação (b) e atenuação limite do mosto (c).....	73
Figura 7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a atenuação limite do mosto contendo castanha portuguesa em função da temperatura ( $X_1$ ) e da proporção de malte ( $X_3$ ). ....	77
Figura 8 - Concentração do extrato real do mosto, da concentração celular, da concentração de etanol e do pH em escala bancada para os mostos puro malte, FCP 30 e FCP 45.....	80
Figura 9 - Concentração do extrato real do mosto, da concentração celular, da concentração de etanol e do pH em escala piloto para os mostos puro malte e FCP45.....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de qualidade e de composição para a água de processamento a ser utilizada na cervejaria.....	25
Tabela 2 - Composição média do grão de cevada e do grão de cevada após processo de malteação.....	30
Tabela 3 - Fração da composição (g/100 g) de diferentes farinhas com relação ao teor de amido, cinzas, fibras, lipídios, e proteínas.....	37
Tabela 4 - Temperaturas de gelificação do amido da farinha de castanha portuguesa para as espécies <i>Castanea sativa</i> e <i>Castanea mollissima</i> . Comparação entre o valor obtido por este trabalho e dados apresentados na literatura. ....	38
Tabela 5 - As características que diferenciam as duas cepas de levedura, <i>ale</i> e <i>lager</i> .....	42
Tabela 6 - Enzimas envolvidas no processo de mosturação da cerveja com os correspondentes temperatura ótima de atividade enzimática (°C), pH ótimo, substrato e produto.....	46
Tabela 7 - Níveis das variáveis independentes a serem consideradas no planejamento experimental fatorial fracionado: temperatura ( $X_1$ ), tempo de pré-cozimento ( $X_2$ ), proporção de malte ( $X_3$ ) e relação insumo:água ( $X_4$ ). ....	61
Tabela 8 - Matriz (valores codificados) do delineamento composto central rotacional.....	62
Tabela 9 - Dados dos ensaios para determinação do extrato da farinha de castanha portuguesa (% m/m). ....	70
Tabela 10 - Matriz (valores codificados) do delineamento composto central rotacional e os resultados correspondentes de extrato da FCP ( $Y_1$ ), tempo de mosturação ( $Y_2$ ) e atenuação limite ( $Y_3$ ) do mosto. ....	74
Tabela 11 - Análises de variância para o modelo quadrático da superfície de resposta: modelo de regressão estimado da relação entre as variáveis respostas e as variáveis independentes do pré-tratamento da FCP.....	75
Tabela 12 - Valores obtidos experimentalmente e valores preditos para a resposta atenuação limite sob condições ótimas. ....	78
Tabela 13 - Parâmetros físicos e análises físico-químicas das cervejas elaboradas em escala laboratorial.....	81

Tabela 14 - Média das notas da análise sensorial das cervejas com castanha portuguesa elaboradas em escala laboratorial.....	82
Tabela 15 - Parâmetros físicos e análises físico-químicas das cervejas elaboradas em escala piloto. ....	85
Tabela 16 - Média das notas da análise sensorial das cervejas com castanha portuguesa elaboradas em escala piloto.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: *Analysis of variance* (análise de variância)

ASBC: *American Society of Brewing Chemists*

CV: Coeficiente de Variação

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

EBC: *European Brewery Convention*

IBU: *International Bitterness Units* (unidade internacional de amargor)

EEL: Escola de Engenharia de Lorena

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

FAN: *Free Amino Nitrogen* (nitrogênio amino livre)

FCP: Farinha de castanha portuguesa

MSR: Metodologia de superfície de resposta

$Q_p$ : Produtividade volumétrica

$R^2$ : Coeficiente de determinação

GRF: Grau real de fermentação

TG: Temperatura de Gelificação

$Y_{p/s}$ : Fator de conversão de substrato em produto

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1	História da cerveja .....	20
2.2	Legislação .....	22
2.3	Matérias-primas .....	23
<b>2.3.1</b>	<b>Água</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Lúpulo</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Malte de cevada</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Adjuntos</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Adjuntos não convencionais</b> .....	<b>32</b>
2.4	Castanha Portuguesa .....	34
2.5	Levedura: micro-organismo e bioquímica .....	38
2.6	Processo de Produção .....	43
<b>2.6.1</b>	<b>Moagem</b> .....	<b>45</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Mosturação</b> .....	<b>45</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Clarificação do mosto</b> .....	<b>47</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Fervura do mosto</b> .....	<b>48</b>
<b>2.6.5</b>	<b>Fermentação</b> .....	<b>49</b>
<b>2.6.6</b>	<b>Maturação</b> .....	<b>49</b>
<b>2.6.7</b>	<b>Acabamento e envase</b> .....	<b>50</b>
2.7	Planejamento experimental .....	51
2.8	Avaliação sensorial .....	52
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
3.1	Objetivo geral .....	54
3.2	Objetivos específicos .....	54
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
4.1	Materiais .....	56
<b>4.1.1</b>	<b>Água</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Malte</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Lúpulo</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Castanha portuguesa (FCP)</b> .....	<b>57</b>

4.2	Micro-organismo .....	57
4.3	Procedimentos gerais mosturador automático .....	57
4.4	Caracterização da Farinha de Castanha Portuguesa .....	58
<b>4.4.1</b>	<b>Granulometria por tamisação .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Determinação da temperatura de gelificação do amido .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Extrato da FCP .....</b>	<b>58</b>
4.5	Metodologia de otimização do pré-tratamento da FCP .....	59
<b>4.5.1</b>	<b>Seleção dos níveis do DCCR .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Planejamento experimental e análise estatística .....</b>	<b>60</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Otimização .....</b>	<b>62</b>
4.6	Preparo das cervejas .....	63
<b>4.6.1</b>	<b>Escala laboratorial .....</b>	<b>63</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Escala piloto .....</b>	<b>64</b>
4.6.2.1	Preparo do inóculo .....	64
4.7	Análise de qualidade físico-química das cervejas .....	65
<b>4.7.1</b>	<b>Parâmetros cinéticos .....</b>	<b>65</b>
4.8	Análise sensorial .....	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
5.1	Caracterização da FCP .....	68
<b>5.1.1</b>	<b>Curva granulométrica da FCP .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Determinação da temperatura de gelificação da Castanha Portuguesa .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Determinação do extrato da FCP .....</b>	<b>70</b>
5.2	Otimização do tratamento da FCP .....	71
<b>5.2.1</b>	<b>Seleção dos níveis dos fatores do DCCR .....</b>	<b>71</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Metodologia superfície de resposta .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Composição do modelo .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Análise da superfície de resposta .....</b>	<b>76</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Validação experimental do ponto ótimo .....</b>	<b>78</b>
5.3	Produção de cerveja em escala de bancada .....	79
5.4	Análises sensorial da cerveja produzida em escala de bancada .....	81
5.5	Produção da cerveja em escala piloto .....	83
5.6	Análise sensorial da cerveja piloto em escala piloto .....	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>



<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>103</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil e no mundo (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2014). Em 2016, o consumo *per capita* brasileiro apresentou valores de 60,4 L/ano (ISOZAKI, 2017). Em uma pesquisa divulgada pela Mintel em 2018 (MINTEL GROUP, 2018) o brasileiro demonstrou um consumo mais consciente priorizando a qualidade ao invés da quantidade da bebida. Nesta pesquisa, 57% dos participantes afirmaram preferir beber quantidades menores de uma cerveja mais cara, em vez de grandes quantidades de uma de menor custo. Concomitantemente a mudança no perfil de consumo da bebida se dá o aumento no número de microcervejarias no país. O Brasil fechou 2018 com 889 cervejarias, 210 a mais do que em 2017, conforme dados do Anuário da Cerveja no Brasil publicado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (MÜLLER; MARCUSSO, 2019).

Tradicionalmente, a cerveja é uma bebida produzida a partir de quatro componentes: água, malte, lúpulo e adjuntos. Estas matérias-primas são processadas para elaboração do mosto cervejeiro que é fermentado pelo agente de fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LODOLO et al., 2008). Estes componentes estão regulamentados no Brasil pelo decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, capítulo VII, seção III que recentemente foi atualizado pelo decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019. Segundo estes, o malte de cevada pode ser substituído por outros cereais, maltados ou não, açúcares e amidos de origem vegetal ou animal, em até 45% em relação ao extrato primitivo. O parâmetro extrato primitivo, ou também conhecido como extrato original, é definido como a quantidade de sólidos solúveis que compõe o mosto que deu origem à cerveja e se expressa em porcentagem (%) em peso (MEDEIROS et al., 2018). Estas outras fontes de carboidratos para o mosto são denominados de adjuntos (D'AVILA et al., 2012) e podem ser classificadas quanto sua fonte (vegetal ou animal), a composição química (açucarados ou amiláceos) ou ainda quanto a tradição de seu uso (convencionais ou não convencionais).

De acordo com Bogdan e Kordialik-Bogacka (2017), entre 85 - 90% do volume de cerveja produzido atualmente no mundo utiliza adjuntos. A sua inclusão tem impacto direto no processo fermentativo e nas propriedades da bebida final. Entre as justificativas para o grande volume de cerveja contendo adjuntos se

encontra as características sensoriais agregadas as bebidas, diversidade de opções, inovação e incorporação de elementos regionais aos produtos (DONADINI; PORRETTA, 2017). Além disso, quando se trata de motivações para experimentar novos tipos de cerveja, a pesquisa da Mintel (2018) aponta que dois quintos, 42%, dos consumidores mencionaram “um novo sabor/sabor inovador (por exemplo, de frutas, mel)”, demonstrando a importante participação dos adjuntos na bebida para difundir a cultura cervejeira.

O grupo de pesquisa na Planta Piloto de Bebidas presente na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL – USP) coordenado pelo Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva desde os anos 90 tem entre suas principais linhas de pesquisa o desenvolvimento de cervejas utilizando adjuntos cervejeiros não convencionais. Diversos estudos já foram desenvolvidos pelo grupo, como cervejas com pinhão (BATISTA, 2014), quinoa (HENDGES, 2014), arroz preto (SANTOS, 2011), banana (CARVALHO, 2009), entre outros, recebendo destaques pelo caráter inovativo (VASCONCELOS, 2017).

Na literatura encontram-se trabalhos caracterizando e demonstrando a utilização de castanha portuguesa (*Castanea sativa* Mill). O objetivo destes estudos era contribuir com a difusão do consumo e elaboração de produtos com maior valor agregado a partir da castanha (DEMIATE; OETTERER; WOSIACKI, 2001; SOUZA et al., 2014; ZHU, 2017). Na idade média a castanha portuguesa chegou a ser considerada a base da alimentação em muitos países europeus devido ao seu elevado teor nutricional, versatilidade gastronômica e principalmente devido a sua abundância natural (BUENO et al., 2018). Já nos dias atuais no Brasil as castanheiras e seus derivados não têm todo o seu potencial aproveitado (DEMIATE; OETTERER; WOSIACKI, 2001). De acordo com Bosco (2012), a castanha possui uma grande sazonalidade de comercialização, apresentando maior volume de venda somente nos meses de novembro e dezembro relacionado aos pratos típicos da época. Porém, quando estocado na forma de farinha, cerca de 60% da produção é destinada ao consumo animal. Além dos fatores comerciais, o seu elevado teor de amido e baixo teor de lipídios em comparação a outras nozes faz com que a castanha portuguesa apresente um interessante potencial para atuar como adjunto cervejeiro. Podendo contribuir com novos sabores e trazer regionalidade a bebida, o desenvolvimento de uma tecnologia que a permita ser

utilizada em bebidas fermentadas pode agregar valor tanto à bebida em si quanto a própria castanha.

Visto que na literatura não há relatos sobre a produção de bebidas fermentadas, incluindo cerveja, utilizando farinha de castanha portuguesa como adjunto, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia para a obtenção deste produto. Uma vez que será utilizado uma matéria-prima regional, poder-se-á contribuir com a economia dos produtores de castanha, melhorando a sazonalidade de vendas, gerando um produto de maior valor agregado e auxiliando na difusão do consumo da castanha portuguesa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 História da cerveja

A região de origem da cerveja é incerta. Essa bebida acompanha a humanidade desde o fim do período neolítico, com o sedentarismo e o desenvolvimento da agricultura (MEUSSDOERFFER, 2009). Diferentes trabalhos sobre registros arqueológicos de cervejas primitivas foram reportados na literatura em regiões diversas e em períodos semelhantes. As principais evidências são provenientes da Mesopotâmia (DAMEROW, 2012) mas também são discutidos relatos encontrados na China (WANG et al., 2016). Até mesmo sua participação na Grécia, região tradicional por seus vinhos, segue sendo estudada (VALAMOTI, 2018). No Egito antigo, de acordo com Godlaski (2011), a produção de cervejas primitivas apresentava grande participação na sociedade da época. Estes fermentados de cereais, principalmente feitos de trigo e cevada, eram atrelados à religião e ao deus Osíris, sendo distribuídos em cultos religiosos. De acordo com o mesmo autor, a produção da bebida consistia em macerar e imergir os cereais em água e, em seguida, moldá-los em forma de bolos e assá-los. Por fim, eram alocados em potes de cerâmica com água e lacrados com barro. Neste recipiente ocorria a fermentação, que resultava em uma bebida semelhante à cerveja.

Esta cerveja primitiva sofreu alterações ao longo do tempo; a primeira grande inovação pode ser considerada a incorporação do lúpulo. De acordo com Delyser e Kasper (1994), o registro da primeira cerveja contendo lúpulo data de 822 d.C., na Alemanha. A utilização do lúpulo na cerveja se difundiu vagarosamente pelo mundo medieval, sendo conhecida na Inglaterra no séc. X, mas se tornando comum somente no séc. XVI. Segundo o autor, entre as outras especiarias utilizadas na época, o lúpulo ganhou destaque pela melhora na conservação do produto.

De acordo com Poelmans e Swinnen (2011), o malte de cevada foi legalmente considerado o principal cereal para elaboração de cerveja em 1516 d.C. com a promulgação da Lei de Pureza da Cerveja Alemã (*Reinheitsgebot*). Naquela época esta lei foi elaborada com a intenção política de regular o comércio de trigo, destinando-o para alimentação ao invés das cervejarias. Esta lei definia que a cerveja deveria ser produzida exclusivamente com água, malte e lúpulo. Na época,

ainda não era conhecida a existência de microrganismos. Ainda de acordo com os autores, devido a esta lei, até hoje estes componentes são considerados, popularmente e legalmente como as matérias-primas imprescindíveis desta bebida.

Outras inovações que ditaram o caminho da cerveja para os moldes atuais são atribuídas ao cientista Louis Pasteur. No século XIX, o cientista francês descobriu que a deterioração dos mostos e das cervejas ocorriam devido a presença de microrganismos e que estes poderiam estar no ar, na água e nos equipamentos empregados (BERCHE, 2012). Graças a esse princípio, limpeza e higiene tornaram-se fundamentais dentro da cervejaria. Além disso, este princípio propiciou o desenvolvimento da pasteurização, método pelo qual o cientista é lembrado (KUNZE, 2004).

Os avanços tecnológicos com relação à cerveja prosseguiram e tiveram também impacto para a humanidade como um todo. Uma delas, como é discutido nos estudos de Hatch e Shultz (2017), é atribuída ao cientista Emil Christian Hansen da cervejaria Carlsberg (Copenhague, Dinamarca). Em seus estudos demonstrou ser possível isolar cepas de leveduras diferentes, e assim desenvolveu o método de cultura pura. Esta descoberta, além de revolucionar a microbiologia, permitiu padronizar o sabor e a qualidade da cerveja. Ainda, segundo Bamforth (2000), na mesma cervejaria Carlsberg, o conceito de pH e o método padrão para a análise do conteúdo de nitrogênio em alimentos foram desenvolvidos pelos químicos dinamarqueses Soren Sorensen e Johan Kjeldahl, respectivamente. Outra inovação se deve a Carl Von Linde, que para permitir o controle da temperatura de fermentação em períodos mais quente do ano desenvolveu a remoção de calor artificialmente com a máquina frigorífica à base de amônia (KUNZE, 2004).

Os avanços científicos levaram ao aprimoramento técnico da cerveja, tornando o seu processo de produção finamente controlado, no qual a excelência de qualidade pode ser assegurada e com boa previsibilidade (BAMFORTH, 2017). Desta forma, com o intuito de organizar as informações, estabelecer a cultura cervejeira, melhorar e uniformizar a indústria em nível técnico, surgiram instituições como a *American Society of Brewing Chemists* (ASBC) e a *European Brewery Convention* (EBC) (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2017; AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS, 2018). Mais recentemente, em 1985, o *Beer Judge Certification Program* (BJCP) foi formado com o objetivo de promover a

apreciação, categorizar a bebida em diferentes estilos com base nas suas características, e reconhecer habilidades na degustação e na avaliação de cervejas (STRONG; ENGLAND, 2015; EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2017).

Esses avanços com relação à cultura cervejeira impactam também o Brasil, como demonstram os dados divulgados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os quais apontam um crescimento no número de micro cervejarias no Brasil atingindo o total de 889 estabelecimentos ao final de 2018 (MÜLLER; MARCUSSO, 2019). Esse crescimento também se deve, em parte, à estrutura das grandes indústrias cervejeiras brasileiras, uma vez que as cervejas especiais, por serem elaboradas com inovação, criatividade, regionalidade e sustentabilidade, ganham destaque no mercado (DONADINI; PORRETTA, 2017).

## 2.2 Legislação

A padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas no Brasil são regulamentados pelo Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009. De acordo com este, bebida é o produto de origem vegetal industrializado, destinado à ingestão humana em estado líquido sem finalidade medicamentosa ou terapêutica (BRASIL, 2009).

As bebidas são classificadas pela legislação como (i) não alcoólica, com graduação alcoólica até 0,5% (v/v), seja ela fermentada ou não, e (ii) bebida alcoólica, com graduação alcoólica acima de 0,5% (v/v) (BRASIL, 2009). O artigo 46 da Lei nº 8.918 define cerveja como “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”, sendo que, malte de cevada e lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo. Os adjuntos cervejeiros podem ser a cevada e os demais cereais aptos para consumo humano, maltados ou não-maltados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal e animal (BRASIL, 2009).

O artigo 38 classifica as cervejas quanto à concentração de extrato primitivo, cor, proporção malte, fermentação (baixa ou alta) e se é alcoólica ou não alcoólica. O Artigo 39 trata das denominações que a cerveja pode receber quanto a seu estilo: *pilsen, export, lager, dortmunder, munchen, bock, malzbier, ale, stout, porter,*



*weissbier*, *alt* e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, o que permite o uso do guia de estilos da *BJCP* (*Beer Judge Certification Program*), que elenca estilos de cervejas encontradas em diversas partes do mundo (STRONG; ENGLAND, 2015).

A denominação “chope” ou “chopp” poderá ser utilizada para cerveja estabilizada biologicamente por processo físico apropriado que não será submetida a processo de pasteurização para o envase (BRASIL, 2009). Algumas práticas também ficam proibidas no processo de produção de cerveja, como a adição de qualquer tipo de álcool, utilização de saponinas ou outras substâncias espumíferas, substituição do lúpulo por outros princípios amargos e, utilização de aromatizantes e/ou edulcorantes artificiais, além de realizar a estabilização ou a conservação biológica por meio de processos químicos (BRASIL, 2009).

## 2.3 Matérias-primas

### 2.3.1 Água

A água é constituinte majoritário na cerveja, entre 92% e 95% em peso, e tem participação em todas as etapas do processo produtivo. Sua importância é tal que a sua disponibilidade e qualidade são dois dos critérios cruciais para definir o local de instalação de uma cervejaria, especialmente as de alta capacidade (EUMANN; SCHILDBACH, 2012; OLAJIRE, 2012). Atualmente, baseado no Relatório Anual de Sustentabilidade da Cervejaria AMBEV (DANTAS, 2017), são necessários 2,94 hL de água para produzir 1 hL de cerveja, levando em consideração somente o processo produtivo dentro da cervejaria.

De acordo com Eumann e Schildbach (2012), a água a ser utilizada em uma indústria cervejeira pode ser proveniente de captações próprias (águas subterrâneas ou superficiais) ou municipais (abastecimento público). Esta deve ser adequada ao consumo humano, sendo então ajustada físico-quimicamente de acordo com as suas diversas aplicações. Os possíveis empregos da água em uma indústria cervejeira podem ser:

- i. Água filtrada;
- ii. Água para serviços gerais;

- iii. Água para processamento;
- iv. Água de diluição; e,
- v. Água para alimentação da caldeira.

De um modo geral, a água filtrada é a água potável destinada ao consumo dos colaboradores da indústria; assim, deve seguir os padrões de qualidade de potabilidade, regulamentada no Brasil pelo art. 5º da Portaria MS nº 2.914/2011. A água para serviços gerais é a água utilizada para processos de limpeza e sanitização. A qualidade microbiológica desta água é fundamental e, neste caso, geralmente utiliza-se  $\text{ClO}_2$  para reduzir a carga contaminante.

A água de processamento é a de maior interesse no processo produtivo, uma vez que é diretamente utilizada na elaboração da bebida. Naturalmente toda água contém íons dissolvidos e suas quantidades e qualidades variam de acordo com a geoquímica de cada região. Segundo Eumann e Schildbach (2012), os íons mais relevantes ao processo cervejeiro são cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Os dois primeiros estão relacionados com a dureza da água que, em geral, é interessante para produção de alguns estilos cervejeiros. O bicarbonato está relacionado a alcalinidade da água e não é desejável no processo. Desta forma, a água de processamento ideal deve conter cálcio como dureza, porém com um baixo valor de alcalinidade. Os níveis de cloretos devem ser menores que 50 ppm, para evitar riscos de corrosão em altas temperaturas. Os sulfatos apresentam grande impacto sensorial na cerveja, o qual é descrito como seco ou adstringente. O balanço entre as concentrações de sulfato e cloreto também é importante sensorialmente podendo, por exemplo, resultar em um caráter maltado mais intenso para a bebida. A presença de sílica está relacionada à turbidez na cerveja e não deve exceder valores de 40 ppm. Os agentes oxidantes, como o cloro nas suas várias formas ou o ozônio, não devem estar presentes na água de processamento.

Além dos sais dissolvidos a água pode apresentar matéria orgânica e compostos gasosos que podem conferir cor, sabor e aroma, além de influenciarem nos processos bioquímicos da produção da bebida alterando a qualidade final do produto. Entre estes compostos se destaca os trihalometanos (THM). Estes são subprodutos da cloração e são geralmente encontrados quando a água do abastecimento público é utilizada como fonte de água para a cervejaria. Os THM são cancerígenos e não devem exceder valores de 10 ppb (EUMANN;

SCHILDBACH, 2012). Os requerimentos de qualidade para a água de processamento estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de qualidade e de composição para a água de processamento a ser utilizada na cervejaria.

<b>Parâmetro</b>	<b>Limite</b>
Fe (ppm)	< 0,1
Mn (ppm)	< 0,05
Turbidez (NTU)	0,0 – 0,5
Ca <sup>2+</sup> (ppm)	70 – 90
Mg <sup>2+</sup> (ppm)	0 – 10
Na <sup>2+</sup> (ppm)	0 – 20
Alcalinidade (ppm de CaCO <sub>3</sub> )	10 – 50
Alcalinidade residual (Kolbach) (ppm CaCO <sub>3</sub> )	< 0
Cl <sup>-</sup> (ppm)	0 – 50
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	30 – 150
NO <sup>3-</sup> (ppm)	0 – 25
NO <sup>2-</sup> (ppm)	0,0 – 0,1
KMnO <sub>4</sub> (ppm O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	< 5
pH	5,0 – 9,5
SiO <sub>2</sub> (ppm)	0 – 25
THMs (ppb)	< 10
H <sub>2</sub> S total (ppb)	< 5

Fonte: Eumann e Schildbach (2012).

Ainda de acordo com os autores, a água de diluição é a água adicionada à cerveja durante a fase de acabamento para ajustar e padronizar o teor alcóolico da bebida. Esta água é similar à de processamento, uma vez que também compõe o produto. Atenção especial deve ser dada ao nível de Ca<sup>2+</sup> na água de diluição, para que o equilíbrio Ca-oxalato não seja afetado, o que aumentaria o risco de formação de cristais de Ca-oxalato. Este desequilíbrio pode levar a um aumento na tendência de ocorrer o a expulsão repentina da espuma ao se abrir a garrafa ou lata de cerveja, efeito conhecido como *gushing*. Isto ocorre porque os cristais atuam como

pontos de nucleação. Além deste fator, a água de diluição deve ser desareada para evitar a oxidação da cerveja.

Já a água de caldeira deve ser virtualmente livre de dureza (<1 ppm de  $\text{CaCO}_3$ ) para evitar a incrustação de sais nos encanamentos e equipamentos. No Brasil, de maneira geral, encontram-se águas de dureza e alcalinidade baixas que são adequadas para a produção de cervejas tipo *lager* e principalmente para o estilo *Pilsen*, que é a denominação genérica do principal estilo de cerveja produzida pelas grandes indústrias cervejeiras no país.

### 2.3.2 Lúpulo

Segundo a literatura (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019; ALMAGUER et al., 2014), os lúpulos são cultivados quase que exclusivamente para a indústria cervejeira, correspondendo a cerca de 97% da produção. É uma planta nativa da Europa, Ásia ocidental e América do Norte. Justamente os países destas regiões também são os maiores produtores desta matéria-prima, com Estados Unidos da América liderando (47.340 toneladas), seguido por Alemanha (32.582 t), China (6.822 t) e República Tcheca (6.797 t) (FAOSTAT, 2018). Os ácidos derivados do lúpulo contribuem para a estabilidade microbiológica da bebida. Já com relação às características sensoriais, os lúpulos são responsáveis pelo típico sabor amargo, por determinados aromas, além de contribuir com a formação e estabilização da espuma (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; ALMAGUER et al., 2014).

O Lúpulo é uma trepadeira, angiosperma, da espécie *Humulus lupulus*, da família Cannabaceae. É cultivada em videiras ou treliças, cresce em torno de 4 a 6 metros, e para uma boa produtividade necessita de invernos longos. É uma planta dioica (com os dois sexos separados) e perene, sendo produtiva por 20 a 30 anos. E, somente as plantas femininas não fecundadas são de interesse cervejeiro (TSCHOPE, 2001; ALMAGUER et al., 2014).

As flores femininas da planta, ou popularmente chamadas de “cones”, possuem um pó resinoso amarelo, estas são as glândulas de lupulina. Nestas, as resinas e óleos essenciais, fundamentais para o processo cervejeiro, são sintetizados e acumulados. A lupulina contém óleos essenciais (0,5 – 3% em peso),  $\beta$ -ácidos ou lupulonas (1,5 – 9,5%) e  $\alpha$ -ácidos ou humulonas (2,0 – 20,0%), que

variam em suas proporções nas diversas variedades da planta (KOSTELECKY, 2011; ALMAGUER et al., 2014).

Os  $\alpha$ -ácidos são um grupo de diferentes ácidos, dentre eles a humolona, a cohumolona e a adhumolona, e em quantidades menores, a poshumolona e a préhumolona. Os  $\beta$ -ácidos são constituídos pela lupolona e outros quatro congêneres: colupolona, adlupolona, prelupolona e poslupolona. A quantidade destes compostos se altera de acordo com a variedade do lúpulo (KOSTELECKY, 2011; ALMAGUER et al., 2014). Segundo Kostelecky (2011), o constituinte principal das resinas são os  $\alpha$ -ácidos.

Os  $\alpha$ -ácidos possuem baixa solubilidade, mas durante o processo de produção da cerveja o mosto é submetido a um processo de fervura que realiza a extração e a isomerização térmica resultando nos iso- $\alpha$ -ácidos. O ácido isomerizado possui maior solubilidade em água e amargor quando comparado aos  $\alpha$ -ácidos. O nível de amargor da cerveja é medido em unidades internacionais de amargor (IBU, do inglês *International Bitterness Units*). O IBU é uma medida de concentração de iso- $\alpha$ -ácidos em partes por milhão, ou seja, em miligramas de iso- $\alpha$ -ácidos por litro de cerveja (KUNZE, 2004).

Segundo Bokulich e Bamforth (2013), o lúpulo possui uma gama de compostos que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas. O composto principal desta atividade são os iso- $\alpha$ -ácidos. Estes compostos interferem no transporte de metabólitos na membrana celular, além de desfazer o gradiente de prótons e modificar o pH intracelular, o que provoca a morte das bactérias por meio de insuficiência nutricional.

Com relação aos  $\beta$ -ácidos, o pH ácido do mosto não favorece a sua já baixa solubilidade em água e apesar de poderem ser oxidados para formar compostos de amargor (resinas duras), estes possuem pouca importância para o processo cervejeiro (KOSTELECKY, 2011; ALMAGUER et al., 2014).

Ainda, a hidrofobicidade é considerada um fator chave dos compostos derivados do lúpulo com relação à estabilização da espuma. De acordo com a literatura, para a sua formação e estabilização se faz necessária a presença de altos níveis de polipeptídios lipofílicos, que são derivados da cevada. No entanto, a presença de níveis mínimos de compostos hidrofóbicos derivados do lúpulo é obrigatória para obter uma espuma estável (FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; JORGE, K.; NOGUEIRA, L. C.; SILVA, F.; TRUGO, 2005; DURELLO; SILVA; BOGUSZ,

2019). Isso ocorre uma vez que o equilíbrio de partição destes compostos é deslocado da cerveja para se concentrar na espuma, aumentando a sua estabilidade (BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

Outro impacto do lúpulo na qualidade da bebida está relacionado com a deterioração da cerveja quando exposta à luz, adquirindo um sabor “*skunky*” (traduzido do inglês como chulé). A causa desse fenômeno conhecido como “*lightstruck*” se dá pela vulnerabilidade dos iso- $\alpha$ -ácidos à luz, principalmente da isohumulona (DE KEUKELEIRE, 2000; DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). Cervejas estáveis à exposição à luz são possíveis com a utilização de iso- $\alpha$ -ácidos reduzidos (DE KEUKELEIRE, 2000).

### 2.3.3 Malte de cevada

A cevada foi um dos primeiros cereais a ser cultivado pelo ser humano, com registros desde o período neolítico (MEUSSDOERFFER, 2009). É uma gramínea do gênero *Hordeum* e é cultivada principalmente em regiões de clima temperado. A produção brasileira de grãos de cevada foi de 301 mil toneladas no ano de 2017, sendo o quinto cereal mais cultivado no país atrás do milho, arroz, trigo, sorgo e aveia, respectivamente.

Segundo a literatura correspondente (KUNZE, 2004; BAMFORTH, 2009; BOKULICH; BAMFORTH, 2013; MEDEIROS et al., 2018), a cevada é o grão mais adequado para a produção de cerveja, isso se dá principalmente pelo seu teor de proteínas e seu alto teor de amido. O teor de amido gerará o extrato fermentescível, ou seja, os sólidos solúveis que são passíveis de serem metabolizados pela levedura. O conteúdo proteico apresenta a qualidade e a quantidade adequada para a nutrição das leveduras durante a fermentação. Concomitantemente, apesar de diversos cereais poderem ser maltados, a cevada é a que apresenta menores dificuldades técnicas durante o processo.

De acordo com Kunze (2004), a malteação é o processo de produção de malte pela germinação controlada do grão de cereal. O objetivo deste processo é potencializar a disponibilidade do amido e desenvolver as enzimas necessárias à sua hidrólise, ou seja, aumento do seu poder diastásico. Como descrito na literatura (BAMFORTH, 2017), a malteação envolve três etapas fundamentais: maceração, germinação e secagem. De maneira simplificada, o procedimento se inicia com a

maceração que consiste na imersão da cevada em água entre 1 e 2 dias (14 - 18°C), seguido pela germinação, que pode variar entre 3 e 7 dias (16 - 20°C), e depois pela secagem, para interromper o processo de germinação (24h, 50 - 110°C). Nesta última etapa de secagem podem ser empregadas menores ou maiores temperaturas e ser realizada ou não a torra do grão o que produzirá diferentes tipos de malte de cevada (KUNZE, 2004; BAMFORTH, 2017).

Os diversos tipos de maltes produzidos, com características enzimáticas e sensoriais diferentes, irão agregar diferentes qualidades à bebida, como os maltes tostados ou caramelos que são essenciais para determinados estilos. Segundo Ferreira e Guido (2018), essas características são decorrentes dos compostos gerados a quente pelas reações de Maillard e de caramelização durante a etapa de secagem do grão. A reação de Maillard é, na verdade, uma cadeia de reações que são iniciadas com a adição de açúcares redutores a proteínas, peptídeos, amino ácidos ou aminas. As reações de caramelização são reações de escurecimento não enzimático assim como as de Maillard, mas na ausência de aminoácidos, ocorrendo entre moléculas de açúcares. Os maltes que passam por uma secagem mais branda possuem um teor maior de enzimas ativas, maior poder diastásico, e são chamados de maltes base. Ainda de acordo com Bamforth (2011), a qualidade do malte tem grande influência na qualidade da bebida, principalmente sobre as características sensoriais da cerveja, como sabor, cor, aroma, corpo e espuma.

Como abordado por Jamar, Jardim e Fauconnier (2011), a qualidade da maltagem resulta das mudanças internas que acontecem no grão de cevada. Estas transformações acontecem com a síntese de enzimas e, conseqüentemente, com o processo de hidrólise de determinados componentes. Os três processos de hidrólise principais no interior do grão de cevada durante este processo são a (i) degradação do amido, (ii) quebra da parede celular e, (iii) hidrólise das proteínas. Uma degradação eficiente dos polissacarídeos, principalmente glucanos, da parede celular é essencial para um malte de qualidade. Na realidade, devido à barreira física da parede celular, a hidrólise desses componentes é um dos primeiros passos esperados para tornar possível o acesso ao conteúdo celular. Caso esta etapa não ocorra de maneira adequada, pode-se levar ao aumento da viscosidade do mosto e turvamento da cerveja, conseqüentemente aumentando o tempo e custo de produção, ou ainda prejudicando a qualidade da bebida (JAMAR; JARDIN; FAUCONNIER, 2011). Como resultado do processo de maltagem o grão

sofrerá uma redução no teor de amido e conseqüente aumento no teor de açúcares, um aumento na fração solúvel do nitrogênio e no teor de proteínas e perderá umidade com a secagem. A Tabela 2 apresenta uma comparação entre a composição média do grão de cevada antes e após a malteação.

Tabela 2 - Composição média do grão de cevada e do grão de cevada após processo de malteação.

Características	Cevada	Malte
Massa do grão (mg)	32 - 36	29 - 33
Umidade (%)	10 - 14	4 - 6
Amido (%)	55 - 60	50 - 55
Açúcares (%)	0,5 - 1,0	8 - 10
Nitrogênio total (%)	1,8 - 2,3	1,8 - 2,3
Nitrogênio solúvel (% de N total)	10 - 12	35 - 50
Poder diastásico (°Lintner)	50 - 60	100 - 250
$\alpha$ -amilase (unidades de dextrina)	traços	30 - 60
Atividade proteolítica	traços	15 - 30

Fonte: Cereda (1983); e, Dragone e Almeida e Silva (2010).

### 2.3.4 Adjuntos

Os adjuntos são fontes de extrato diferentes do malte de cevada ao mosto cervejeiro (BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017). Esta definição concorda com a legislação brasileira (BRASIL, 2009). De acordo com Bogdan e Kordialik-Bogacka (2017), atualmente, cerca de 90% do volume de cerveja comercializada no mundo são produzidos com adjuntos. No Brasil, estudos demonstram que somente 4,3% das cervejas comercializadas eram cervejas “puro malte” (SLEIMAN et al., 2010). Os adjuntos presentes nestas cervejas são os já tradicionalmente empregados na produção no Brasil e no mundo. São eles milho, arroz, trigo, aveia e o sorgo (SLEIMAN et al., 2010; D’AVILA et al., 2012; BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017). Um dos fatores que leva a esse fenômeno é a grande competitividade do mercado cervejeiro e pressão para atingir menores custos de produção. Além disso, a utilização desses materiais pode ser realizada de acordo com a disponibilidade



regional, assim contribuindo com a economia local (BATISTA; ALMEIDA e SILVA, 2017; BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017).

Quando devidamente escolhidos, os adjuntos podem contribuir com os parâmetros de cor, sabor, aroma, corpo, estabilidade coloidal ou da espuma e até mesmo com o aumento da vida útil da cerveja. Também modificam o perfil de açúcares e de aminoácidos no mosto. O uso de adjuntos pode causar alterações tanto negativas quanto positivas na qualidade do produto (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; BAMFORTH, 2017; BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017). Atualmente, o processo de produção de cerveja é finamente controlado tecnologicamente, em que a excelência de qualidade da cerveja pode ser assegurada e com boa previsibilidade (BAMFORTH, 2017). Desta forma, é de suma importância compreender o impacto de complementos específicos, como os adjuntos, sobre as diferentes propriedades da cerveja, a fim de assegurar o uso adequado.

De forma geral, os adjuntos podem ser agrupados em duas classificações, os açucarados e os amiláceos. As matérias-primas açucaradas podem ser utilizadas para ajustar e desenvolver características das cervejas com pequenos custos à cervejaria. Esta classe de adjuntos contém açúcares solúveis e passíveis de serem diretamente metabolizados pela levedura, permitindo seu uso sem dificuldades técnicas (KUNZE, 2004; D'AVILA et al., 2012). Açúcares de cana são menos utilizados do que xaropes obtidos de amido de milho por hidrólise enzimática. Também se empregam xaropes de malte e xarope caramelizado, que proporcionam cor, aroma e sabor em algumas cervejas escuras (D'AVILA et al., 2012). Os adjuntos açucarados são comumente utilizados para produzir mostos concentrados, que permitem aumentar a capacidade produtiva da cervejaria, processo conhecido como *high gravity*. A sua aplicação permite que o grau real de fermentação (GRF), entendido como a porcentagem de extrato original consumida durante a fermentação, seja ajustado facilmente (BOGDAN e KORDIALIK-BOGACKA; 2017).

Já os adjuntos amiláceos normalmente não são maltados, e a obtenção dos açúcares fermentescíveis se dá através da gelificação, solubilização e hidrólise do amido (KUNZE, 2004). Na atualidade, são utilizados adjuntos que já foram pré-processados antes de adquiridos pela cervejaria. Além disso, o adjunto é escolhido segundo o tipo de cerveja a ser elaborada, a disponibilidade do adjunto e os

equipamentos disponíveis na cervejaria (BOGDAN e KORDIALIK-BOGACKA; 2017).

### 2.3.5 Adjuntos não convencionais

O uso de matérias-primas diferentes não é recente e algumas frutas já participam em estilos de cerveja bem estabelecidos, por exemplo. De acordo com Keersmaecker (1996), elas já são utilizadas há séculos na Bélgica como nas cervejas *kriek* e *framboise* que levam cereja e framboesa, respectivamente. Outras frutas são utilizadas também como pêssego e ameixa. As frutas são misturadas à cerveja acabada e permitem uma fermentação adicional para preparar estas cervejas belgas de frutas na Bélgica.

A primeira menção na literatura ao termo não convencional relacionada ao processo cervejeiro apareceu em 1999 no trabalho publicado por Grujic (1999). O autor descreve sobre a aplicação de matérias-primas e procedimentos não convencionais na produção de mosto, principalmente envolvendo a decomposição térmica da cevada até a sua gelificação, a decomposição enzimática com enzimas termoestável e o método de extrusão por decomposição térmica para obtenção de flocos de cevada. Porém, aparentemente o autor refere-se apenas aos procedimentos não convencionais, visto que o processo de malteação surgiu há milhares de anos na Mesopotâmia, onde foi descoberto os benefícios deste processo, sem dúvida, por acidente, juntamente com a apreciação sensorial dos grãos germinados. Portanto, o uso da cevada nativa, como se refere o autor, existe desde as civilizações antigas.

Os estudos para produção de cerveja, especificamente com mostos com teores de açúcares mais elevados que os tradicionais, iniciaram-se em 1997, com o Grupo de Processos Fermentativos da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (Faenquil), contando com o apoio de órgãos de fomento como a FAPESP, a CAPES e a CNPq (DRAGONE; MUSSATTO; ALMEIDA E SILVA, 2005; DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010). Os autores ressaltam que a linha de pesquisa era inédita no país e de suma importância junto ao processo produtivo, com a finalidade de aumentar a produtividade das empresas, que poderiam ao mesmo tempo utilizar mostos mais concentrados para aumentarem sua capacidade produtiva enquanto manteriam a qualidade da bebida. Outro setor que seria

beneficiado seria os das microcervejarias, ainda no início de sua ascensão na época e contando com cerca de 35 empresas, que geralmente tinham capacidade limitada de produção e sem capital para investimento.

Aliado a esta particularidade das microcervejarias o grupo de pesquisa passou a pesquisar com o intuito de obter uma bebida com um menor custo, adjuntos regionais, como o arroz preto de Pindamonhangaba - SP (ANDRADE, 2007), a banana de Cristina - MG (CARVALHO, 2009) e a pupunha de Manaus - AM (SOUZA, 2010). Ao observar que estes adjuntos não eram utilizados pelas cervejarias industriais e nem pelas microcervejarias, o coordenador dos projetos, passou a denominar estas matérias-primas como adjuntos não convencionais. Prova disto, é que ainda não existe nenhum trabalho científico publicado na literatura com esta terminologia em língua inglesa, a não ser os de autoria de Almeida e Silva. Diferentes estudos considerando a aplicação de diferentes adjuntos na cerveja já foram realizados desde então, entre eles, estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, como com a utilização de banana (CARVALHO, 2009), arroz preto (SANTOS, 2011), pinhão (BATISTA, 2014), quinoa (HENDGES, 2014), laranja (MANZOLLI, 2015), entre outros.

Analisando o estado da arte da ciência correspondente, artigos recentes na literatura estudam diferentes adjuntos como arroz preto na china (ZHANG et al., 2019), farinha de pinhão (JORGE et al., 2018) e polpa de cacau (NUNES et al., 2017) no Brasil, Caqui na Coreia do Sul (CHO et al., 2018), fava de feijão no Reino Unido (BLACK et al., 2019), batata doce na África do Sul (PANDA et al., 2015) e o triticale na Alemanha (GLATTHAR; HEINISCH; SENN, 2005; GLATTHAR et al., 2018a, 2018b) que apesar de não se apresentarem como “não convencionais” podem ser entendidos como tal.

Por uma ótica mais atual, faz-se necessário atualizar a participação destas matérias-primas para além da redução dos custos. Os adjuntos não convencionais permitem elaborar cervejas com caráter regional trazendo inovação e criatividade as bebidas, o que vêm de encontro com o atual e crescente movimento cervejeiro artesanal (VASCONCELOS, 2017).

## 2.4 Castanha Portuguesa

As castanhas são os frutos das árvores *Castanea spp.* que pertencem à família *Fagaceae*. São plantas nativas do hemisfério norte e cultivadas pelo mundo para fins alimentares pela suas nozes e para utilização de sua madeira, que é de qualidade considerável (DEMIATE; OETTERER; WOSIACKI, 2001; ZHU, 2017). De acordo com o boletim técnico elaborado pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, CATI (BUENO et al., 2018), historicamente as castanhas já foram consideradas a grande base da alimentação de alguns povos na Idade Média, sendo utilizadas em sopas, guisados e cozidos, e até na preparação de pão e biscoitos, bem como em épocas em que os cereais escasseavam. Atualmente, não passam de guloseimas de época.

Os dados mais recentes apresentados pela FAO (*Food and Agriculture Organizations of the United States of America*) demonstram que a produção mundial de castanha aumentou na última década e atingiu o valor de 2,2 milhões de toneladas produzidas só no ano de 2016 (FAOSTAT, 2018). A espécie tradicionalmente cultivada no Brasil e na América do Sul é a *Castanea sativa*, mas recentemente a espécie chinesa *Castanea molissima* também demonstrou boa adaptação às condições de cultivo no Brasil (BOSCO, 2012; BUENO; PIO, 2014; ZHU, 2017).

Os castanheiros europeus produzem madeiras e castanhas de valor agregado considerável (SOUZA, et al.; 2014; DEMIATE, et al.; 2001). Em 2017, o quilo de castanha foi comercializado, em média, a R\$ 34,00 no mercado atacado brasileiro (CEASA, 2017). No Brasil, as castanheiras e seus derivados não têm todo o seu potencial aproveitado, são cultivadas por efeitos paisagísticos em fazendas e praças públicas, mas não para a utilização de sua madeira ou das castanhas (DEMIATE, et al.; 2001). Como produto apresentam uma grande sazonalidade de vendas, tendo um maior volume de comercialização nos meses de novembro e dezembro (BOSCO; 2012). Ainda assim, nesta época do ano, a participação da castanha nacional é pequena, representando apenas 40% das vendas (BUENO; PIO, 2014).

Segundo a literatura (DEMIATE; OETTERER; WOSIACKI, 2001; BUENO; PIO, 2014; ZHU, 2017), a castanha portuguesa é uma noz, ou seja, uma fruta, e é composta por uma casca dura não comestível e uma semente comestível. A

maioria das sementes vem de frutas que naturalmente se libertam da casca, ao contrário das nozes, como avelãs e castanhas, que têm paredes duras e se originam de um ovário composto. Popularmente (no sentido culinário) uma grande variedade de sementes secas é chamada de nozes, mas em um contexto botânico "noz" implica que a casca não se abre para liberar a semente. Desta forma, amêndoas, pistache, e a castanha-do-pará não são nozes no sentido botânico.

A época de colheita ocorre principalmente nos meses de novembro a dezembro (*Castanea Sativa*), mas dependendo da espécie pode ocorrer até fevereiro (*Castanea Molissima*). Sobre um ponto de vista prático, a colheita deve ser realizada logo que o fruto cai da castanheira. Esta etapa deve ser efetivada rapidamente, pois a noz apresenta processo de decomposição acelerado. O gérmen morre e desidrata rapidamente, além de ser facilmente contaminada por fungos quando em contato com o solo (DEMIATE, *et al.*; 2001; BOSCO; 2012). Desta forma, para ter-se um melhor aproveitamento da castanha, ela pode ser processada na forma de farinha seca para a sua utilização em produtos alimentícios (SOUZA *et al.*, 2014).

De acordo com o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2005), define-se farinhas como “os produtos obtidos de partes comestíveis de uma ou mais espécies de cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos.”. Este regulamento também estabelece alguns requisitos específicos, como farinhas devem apresentar umidade máxima de 15,0 % (g /100 g).

Na literatura encontram-se trabalhos caracterizando e demonstrando a utilização da farinha de castanha portuguesa (FCP) em alimentos, com a finalidade de difusão do seu consumo e agregação de valor (DEMIATE; OETTERER; WOSIACKI, 2001; BOUNOUS, 2005; BORGES *et al.*, 2008; DE VASCONCELOS *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2014). A produção da FCP é realizada em diferentes regiões e empregado de diferentes formas na alimentação. O processamento da castanha portuguesa para produção da farinha envolve as etapas de secagem, descasque, triagem, torrefação e moagem da noz. O produto caracteriza-se por acentuado sabor adocicado, cores variáveis entre branco amarelado e arruivado, aromas olfativos e gustativos complexos e únicos e teor de umidade não superior

a 10% (DEMIATE; OETTERER; WOSIACKI, 2001). O processamento e as características do produto estão de acordo com a regulamentação da ANVISA sobre farinhas. Como reportado por Zhu (2017), o processo de secagem, e em alguns casos de torrefação, da castanha reduz o conteúdo de álcoois e terpenos, ao mesmo tempo que aumenta o teor de compostos derivados das reações de Maillard.

A castanha portuguesa (*Castanea sativa* Mill) é uma interessante fonte nutricional. A textura das nozes torradas é semelhante à de uma batata cozida firme e não é crocante em comparação com outras nozes (KOREL; BALABAN, 2008). As castanhas contêm vários componentes funcionais importantes: polifenóis (por exemplo, elagitaninos), vitaminas, fibras alimentares, minerais e ácidos graxos insaturados (KOREL; BALABAN, 2008; ZHU, 2017; BUENO et al., 2018). Nutricionalmente ela possui equivalência alimentícia com a batata e o trigo, além de não possuir glúten, se tornando uma importante alternativa de alimentação às pessoas celíacas (GOMES; VALENTINI; CASTRO, 2013; SOUZA et al., 2014). O seu consumo é apreciado em diversas regiões do mundo, sendo consumida de diversas formas, como cozida, assada, cristalizada e na forma de farinha (SOUZA et al., 2014; BUENO et al., 2018). Estes fatores chamam a atenção com o potencial da castanha portuguesa ser utilizada como adjunto cervejeiro.

Considerando o sorgo como um adjunto cervejeiro tradicional e a cevada não maltada e a farinha de pinhão como adjuntos não convencionais já estudados na literatura recente (KUNZE, 2004; BUENO et al., 2018; JORGE et al., 2018). A composição da farinha de castanha portuguesa (FCP) não apresenta características peculiares. Ou seja, apresenta potencial para atuar como adjunto cervejeiro como as demais. A FCP apresenta elevado teor de amido e um baixo teor de lipídios inclusive em comparação com o sorgo, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Fração da composição (g/100 g) de diferentes farinhas com relação ao teor de amido, cinzas, fibras, lipídios, e proteínas.

Fração g/100 g	FCP*	Sorgo	Cevada não maltada	Farinha de pinhão
Amido	75,1	70,0	70,0 - 85,0	63,75
Cinzas	2,03	1,6	2,0 - 4,0	2,51
Fibras	16,75	n.d.	n.d.	5,05
Lipídios	1,49	4,0	1,5 – 2,0	1,17
Proteínas	4,61	10,0	11,5	6,36

FCP: Farinha de castanha portuguesa; \*: FCP com umidade de 7,55%.

Fonte: (KUNZE, 2004; BUENO et al., 2018; JORGE et al., 2018).

A utilização de adjuntos, em geral, leva a uma redução do conteúdo de substâncias nitrogenadas (BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017). Analisando a composição centesimal da FCP em comparação com outros adjuntos, Tabela 3, pode-se notar um menor teor de proteínas, quando comparado com os demais adjuntos. O teor e o perfil de substâncias nitrogenadas têm grande participação no processo de produção da cerveja, influenciando a cor, pelas reações de Maillard, a nutrição da levedura, a textura, formação de espuma e retenção de CO<sub>2</sub> (MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014).

Uma informação importante sobre o adjunto que também deve ser levada em consideração para a sua utilização no processo cervejeiro é a temperatura de gelificação do seu amido. Como descrito na literatura (KUNZE, 2004; KROTTENTHALER; BACK; ZARNKOW, 2009), adjuntos amiláceos com temperaturas de gelificação do seu amido entre 67 °C e 78 °C devem passar por uma etapa de pré-cozimento. Isso se deve ao fato de a gelificação do seu amido só ocorrer em temperaturas em que as enzimas do malte já se encontram desnaturadas. A Tabela 4 apresenta valores de temperatura de gelificação por diferentes autores para a *Castanea sativa* e para a *Castanea molíssima*, dados compilados por Zhu (2017). A análise dos dados da literatura sugere que as duas espécies avaliadas devem passar por um pré-cozimento para uma utilização mais eficiente.

Tabela 4 - Temperaturas de gelificação do amido da farinha de castanha portuguesa para as espécies *Castanea sativa* e *Castanea mollissima*. Comparação entre o valor obtido por este trabalho e dados apresentados na literatura.

Espécie	Sólido/água (m/m)	T <sub>c</sub> (°C)	Referência
<i>C. sativa</i>	~1:3	67,9	Cruz et al., 2013
<i>C. sativa</i>	~1:3	68,8	Lemos et al., 2015
<i>C. mollissima</i>	1:5	77,0	Yang et al., 2010
<i>C. mollissima</i>	2:3	73,8	Lee et al., 2015
<i>C. mollissima</i>	n.d.	67,6	Zhang et al., 2014

Fonte: Dados compilados por Zhu (2017).

Mesmo sendo um alimento com diversas formas de consumo e tendo sua aplicação estudada em diferentes alimentos, não há nenhum registro de trabalhos avaliando o uso de farinha de castanha portuguesa como adjunto de malte na produção de cervejas, tão pouco sobre a aceitação sensorial deste produto.

## 2.5 Levedura: micro-organismo e bioquímica

As leveduras são micro-organismos eucarióticos predominantemente unicelulares do Reino Fungi, desprovidas de clorofila e de forma oval, com comprimento entre 8 e 10µm e largura entre 5 e 7µm. Estas, de acordo com a literatura, contribuíram para o processo científico, constituindo o modelo celular de escolha na elucidação dos processos bioquímicos e metabólicos fundamentais das células vivas eucarióticas (BOULTON; QUAIN, 2006; CARVALHO; SILVA; ALMEIDA e SILVA, 2006). A habilidade de converter açúcar em etanol é característica de um pequeno grupo de micro-organismos, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a que mais se destaca, pela produção e tolerância à alta concentração de etanol (KUNZE, 2004; BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

Conforme descrito na literatura (CARVALHO; SILVA; ALMEIDA e SILVA, 2006; BOKULICH; BAMFORTH, 2013), o metabolismo das leveduras pode ser tanto aeróbico quanto fermentativo, tendo o oxigênio como principal regulador. Na presença de oxigênio como acceptor final de elétrons, a levedura metaboliza a glicose, ou outros sacarídeos, pela via glicolítica e, posteriormente, oxida o piruvato resultante pelo ciclo de Krebs. Gera-se como coprodutos desta via o CO<sub>2</sub>, a água



e a energia suficiente para manutenção e reprodução celular. Em condição de anaerobiose, a célula metaboliza os carboidratos a piruvato também pela via glicolítica e reduz este produto pela via fermentativa alcoólica, gerando etanol, CO<sub>2</sub>, recuperando os cofatores oxidados e obtendo energia para sua manutenção. O metabolismo aeróbico produz mais ATP e, conseqüentemente, promove o crescimento da biomassa. As leveduras utilizam oxigênio para a síntese de esteróis, que são utilizados para manutenção das paredes celulares flexíveis e importantes para o crescimento celular (KUNZE, 2004).

Em condições anaeróbicas apenas a fermentação é possível. Energeticamente, sendo-lhes mais favorável respirar do que fermentar, as leveduras fermentam o menos possível, favorecendo a respiração (efeito Pasteur). Contudo, nas cepas cervejeiras, o efeito Pasteur está normalmente ausente.

Já durante o crescimento aeróbio tanto a fermentação quanto a respiração podem contribuir para o catabolismo da glicose. Dada a elevada concentração inicial de açúcares no mosto, que leva a repressão catabólica do metabolismo oxidativo na *Saccharomyces cerevisiae*. Este fenômeno é conhecido como efeito Crabtree e as cepas de leveduras cervejeiras são Crabtree positivas (BOULTON; QUAIN, 2006).

Além do etanol, a levedura produz uma ampla gama de outros grupos de compostos sensorialmente importantes para a cerveja (LODOLO et al., 2008). Isso torna ainda mais importante o conhecimento sobre seu metabolismo. Todas as leveduras cervejeiras produzem no meio glicerol, dicetonas vicinais, álcoois, ésteres, ácidos graxos de cadeias curtas, ácidos orgânicos e compostos contendo enxofre (BOULTON; QUAIN, 2006; BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

A Figura 2 apresenta um esquema representativo resumido das principais atividades metabólicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que influenciam a qualidade sensorial da cerveja. De acordo com a literatura (KUNZE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006), os níveis de cada categoria de metabólito dependem, em parte, da cepa de levedura utilizada. Durante o metabolismo, álcoois superiores são formados como coprodutos da síntese de aminoácidos a partir do piruvato por uma via anabólica, ou podem ser produzidos pelo catabolismo de aminoácidos pela via de Ehrlich.

Os ésteres são um dos compostos mais voláteis presentes na cerveja, tendo assim grande impacto no aroma da bebida. A sua produção está relacionada com

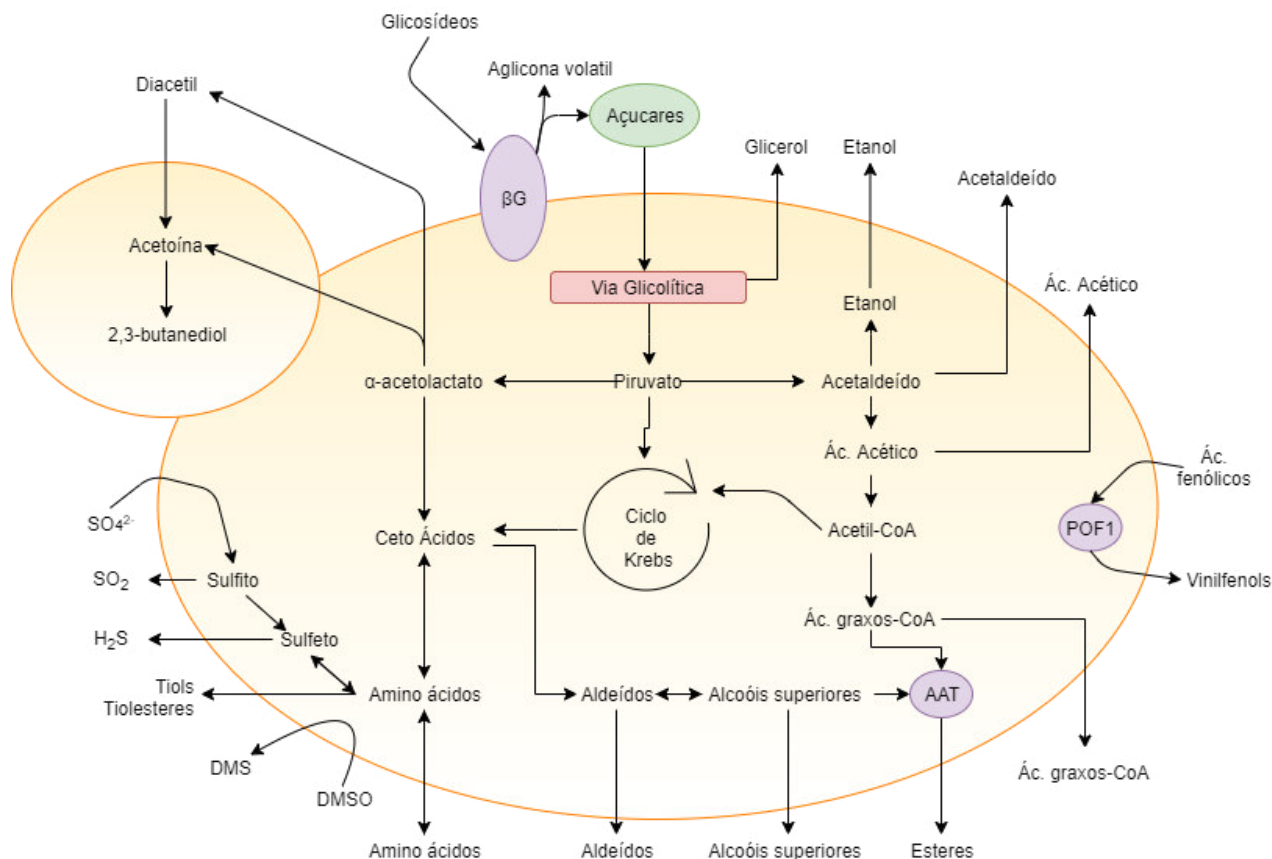
o crescimento da biomassa de levedura e ao metabolismo de lipídios. Estes ésteres se formam pela reação entre etanol ou álcoois superiores com um acil-CoA éster, e pode ser formado também por enzimas esterases trabalhando na reação reversa (KUNZE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006; BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

Com relação aos produtos que contêm enxofre, como SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S, estão relacionados *a priori* pela ação da enzima sulfito redutase. Sulfeto de dimetila (DMS) contribui com o caráter sensorial das cervejas tipo *lager* (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). O DMS pode ser derivado da degradação térmica de precursores derivados do malte. Algumas cepas de levedura podem reduzir o sulfóxido de dimetila (DMSO) a DMS (KUNZE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006).

As dicetonas vicinais tem grande participação sensorial também. O diacetil é um dos principais *off-flavors* encontrado nas cervejas. Sua formação se dá naturalmente com o crescimento celular em um metabolismo atrelado a síntese de valina e isoleucina. O diacetil pode ser convertido pela própria levedura em 2,3-butenodiol que é menos perceptível sensorialmente (KUNZE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006).

A composição do mosto influencia a atividade metabólica da levedura; conseqüentemente, determina as propriedades da cerveja como produto acabado. O mosto tem de conter a quantidade adequada de açúcares fermentescíveis e nutrientes para a levedura e precursores de sabor. Os carboidratos nos mostos são os substratos do processo e atuam como a fonte de carbono e energia para a levedura, sendo os principais relacionados com o processo cervejeiro a glicose, maltose e a maltotriose. A levedura utiliza os compostos nitrogenados do mosto para sintetizar suas substâncias celulares. Uma concentração entre 200 e 230 mg/L de nitrogênio amínico livre (FAN) é ideal para desenvolvimento de fermentações em mostos com 12°P (KUNZE, 2004), sendo descritos na literatura valores de até 140 mg/L como os mínimos para a fermentação de mostos entre 10-12°P (O'CONNOR-COX; INGLEDEW, 1991).

Figura 1 - Esquema representativo resumido das principais atividades metabólicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que influenciam a qualidade sensorial da cerveja.



AAT: enzima álcool acetiltransferase; DMS: dimetilsulfureto; DMSO: dimetilsulfóxido; βG: β-glicosidase; POF1: *phenolic off-flavor production gene 1*.

Fonte: Adaptado de Bokulich e Bamforth (2013).

A classificação entre os tipos de cerveja é dada de acordo com o comportamento do agente de fermentação, as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), entre *ales* e *lagers*. Nas cervejas do tipo *ale*, as leveduras se mantêm na superfície do meio de fermentação e apresentam temperatura de fermentação preferencial entre 16 e 24°C, sendo também conhecidas como cervejas de “alta fermentação”. Enquanto que as cervejas do tipo *lager*, também denominadas de “baixa fermentação”, as leveduras acumulam-se no fundo do reator, e a fermentação ocorre em temperaturas mais baixas, entre 6 e 15°C (LODOLO et al., 2008; MOURA-NUNES et al., 2016). Outra diferença entre as cepas se dá pela capacidade de utilização de melibiose (glicose-galactose). As do tipo *lager* possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular α-galactosidase que permite a utilização desse dissacarídeo. A Tabela 5 apresenta as características que diferenciam as duas cepas de levedura.

Tabela 5 - As características que diferenciam as duas cepas de levedura, *ale* e *lager*.

<b>Características</b>	<b>Cepa Lager</b>	<b>Cepa Ale</b>
<b>Tipo de fermentação</b>	Baixa	Alta
<b>Floculação</b>	Boa	Menos eficiente
<b>Temperatura ideal de fermentação</b>	Abaixo de 15°C	Acima de 15°C
<b>Máxima temperatura de crescimento</b>	32 - 34°C	38 - 40°C
<b>Utilização de maltotriose</b>	Mais completa	Menos eficiente
<b>Utilização de melibiose</b>	Sim	Não
<b>Volatilização de compostos sulfurosos</b>	Mais	Menos
<b>Transporte de frutose</b>	Simporte ativo de prótons	Difusão facilitada

Fonte: Adaptado de Deak (2007).

Em processos fermentativos, os agentes biológicos da fermentação devem apresentar determinadas características para serem empregados no processo. Como descrito na literatura (SCHMIDELL; LIMA; AQUARONE, 2001), espera-se que o microrganismo a ser utilizado em um processo fermentativo (i) apresente elevada eficiência de conversão de substrato em produto; (ii) permita o acúmulo do produto no meio; (iii) não produza substâncias incompatíveis com o produto; (iv) não seja patogênico; (v) não exija condições de processo muito complexas; (vi) não exija meios dispendiosos; (vii) permita rápida liberação do produto; e (viii) apresente baixa mutabilidade.

Dowhanick (2002) define as principais propriedades que idealmente as leveduras cervejeiras devem apresentar para serem consideradas “boas produtoras de cerveja”. Assim, além das propriedades discutidas para processos fermentativos em geral, a levedura deve (i) ser capaz de manter um meio de fermentação livre de quantidades de metabólitos indesejáveis, responsáveis por sabores de enxofre, fenólicos ou de alcoóis amílicos; (ii) ser facilmente removida do meio de fermentação por floculação, centrifugação; (iii) ser suficientemente viável e depois da recuperação possa ser re-inoculada no mosto, apresentando um mínimo de autólise e um máximo de confiança; (iv) apresentar uma velocidade rápida de fermentação sem crescimento celular excessivo; e (v) apresentar uma produção reprodutível de certos níveis de compostos do *flavor* e do aroma.

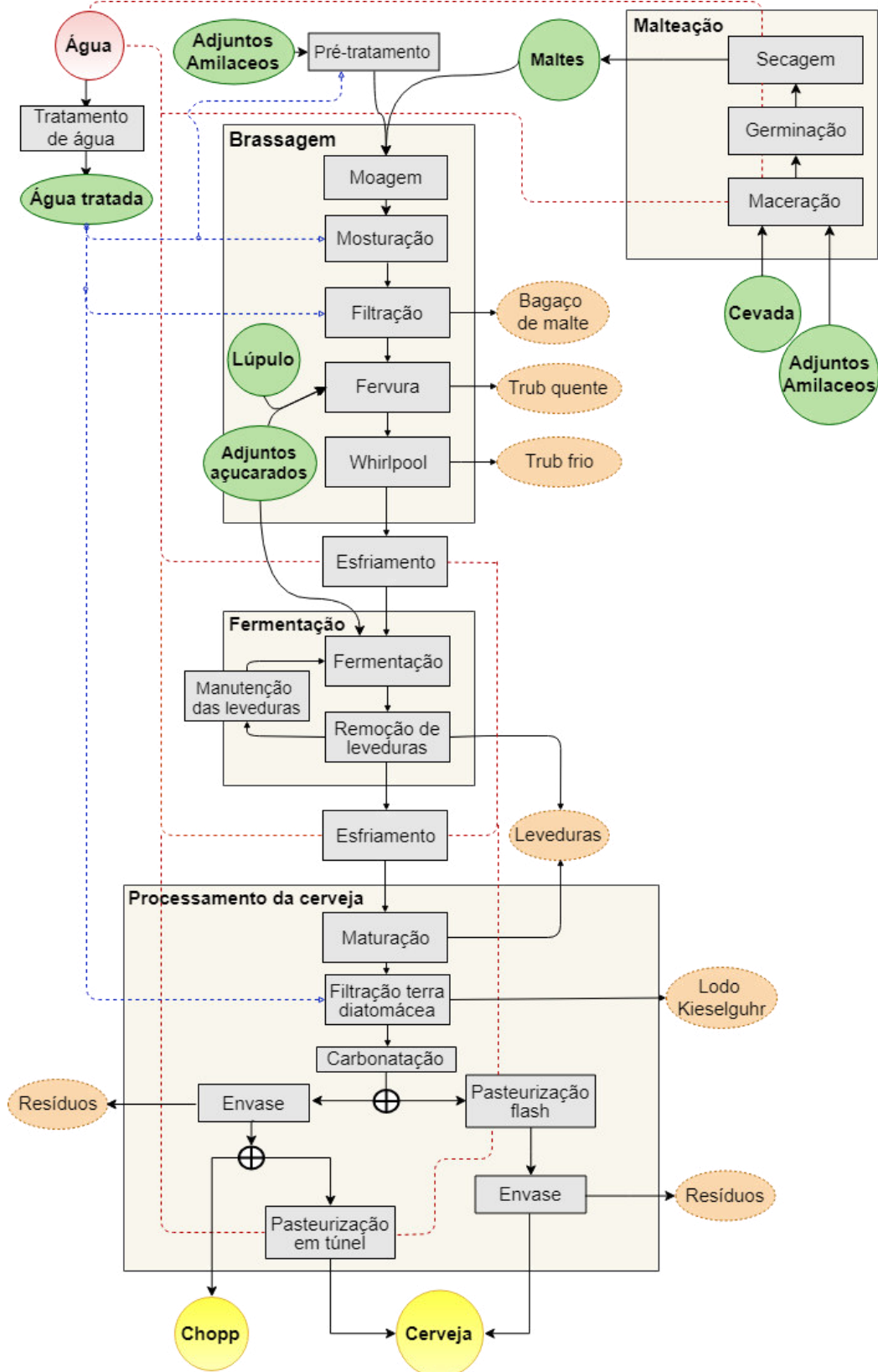
## 2.6 Processo de Produção

O processo de produção de cerveja pode passar por algumas variações conforme o fabricante, o tipo, o estilo da bebida e a escala. A sua produção é um processo fermentativo e como este possui fases fundamentais a serem consideradas: (i) fase de preparo; (ii) fase de desenvolvimento e, (iii) fase de recuperação e caracterização do produto. Estas etapas são definidas de acordo com as características do processo, como, por exemplo, o microrganismo a ser utilizado, o meio de cultura e forma de condução do processo (SCHMIDELL; LIMA; AQUARONE, 2001).

A primeira etapa, fase de preparo, compreende o preparo do meio de fermentação (mosto cervejeiro), do inóculo (suspensão de células do agente de fermentação) e do reator. O preparo criterioso do meio de fermentação é uma etapa crucial. Nesta, os parâmetros e componentes do meio devem ser estabelecidos a fim de se condicionar a atividade do agente biológico para uma finalidade de interesse e com a melhor performance. Para tanto, devem ser ajustados fatores como a concentração de substrato, o pH, a concentração de macro e micronutrientes, e deve ser realizada a redução da carga contaminante. Além disso, este meio deve apresentar certas propriedades, entre elas, minimizar problemas na recuperação do produto e não dificultar o controle do processo (SCHMIDELL; LIMA; AQUARONE, 2001).

Outro aspecto importante na execução do processo fermentativo é quanto à sua forma de condução, ou seja, a forma de operação de um dado biorreator. De acordo com a literatura (DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010; BAMFORTH, 2017), a forma de condução mais aplicada à produção de cerveja é o processo descontínuo simples com recirculação de células. Ao encerrar uma batelada, realiza-se a separação das células por centrifugação ou por decantação no interior do próprio reator, e somente o líquido fermentado segue para a etapa seguinte, e o agente biológico pode ser aproveitado. Este procedimento apresenta a vantagem de se evitar o preparo de um novo inóculo a cada nova batelada, promovendo, conseqüentemente, redução de custo e, do chamado, tempo morto. Esta forma de condução é possível desde que se possa manter condições de assepsia e manter o agente biológico suficientemente ativo. As principais operações do processo de produção de cerveja estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Diagrama de blocos do processo produtivo da cerveja com matérias-primas e principais resíduos.



Fonte: Adaptado de Kunze (2004) e Briggs, E. D.; Boulton, C.A.; Brookes, P. A.; Stevens (2004).

### 2.6.1 Moagem

Nesta etapa de moagem do malte, a casca de cevada se quebra, expondo o endosperma amiláceo e o conteúdo do gérmen (predominantemente enzimático) (KUNZE, 2004). Nas cervejarias a moagem do malte tem uma relação fundamental com o equipamento a ser utilizado para a filtração do mosto cervejeiro (etapa descrita posteriormente). Caso o equipamento de filtração seja um tanque ou uma tina de filtração deve ser realizada a moagem grossa, entretanto, se o equipamento for um filtro-prensa, a moagem fina pode ser realizada (KUNZE, 2004).

A moagem do malte impacta diretamente a rapidez das transformações físico-químicas, o rendimento, a clarificação e a qualidade do produto. Como descrito na literatura (KUNZE, 2004; DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010), com relação a moagem grossa, esta deve ser realizada de modo uniforme, de forma a se obter: (i) o rompimento da casca no sentido longitudinal, expondo o endosperma, porção interna do grão; (ii) a desintegração total do endosperma, promovendo uma melhor atuação enzimática e (iii) uma proporção mínima de farinha com granulometria muito fina, evitando a formação de substâncias que produzam uma quantidade excessiva de pasta dentro da solução.

A moagem a seco é mais frequentemente utilizada pela indústria cervejeira; no entanto, a moagem úmida tornou-se recentemente outro método popular. Para otimizar as condições de moagem com um aumento na conversão de amido em açúcares redutores, encontram-se recomendações na literatura com relação à moagem úmida de malte, com 10 ou 20% de umidade (MOURA; MATHIAS, 2018).

### 2.6.2 Mosturação

Como descrito por Kunze (2004), a moagem disponibiliza o conteúdo dos grãos de malte e dos adjuntos amiláceos, porém estes não são totalmente solúveis. Dessa forma, é necessário tornar estes materiais solúveis por um processo enzimático denominado de mosturação. Todos os sólidos solúveis presentes no mosto são denominados de extrato e a sua unidade usual é o grau Plato (grama de sólidos solúveis por 100 gramas de solução, expresso em sacarose e medido a 20°C) (MEDEIROS et al., 2018).

A atividade enzimática na mosturação depende das condições do meio. Devido à estrutura tridimensional das enzimas, a alteração do pH se torna um parâmetro essencial no preparo do mosto cervejeiro. Ademais, a atividade das enzimas depende, sobretudo, da temperatura. Os principais processos enzimáticos que ocorrem nesta etapa compreendem: (i) hidrólise do amido; (ii) degradação dos  $\beta$ -glucanos; (iii) degradação de proteínas; entre outros (BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, 2004; KUNZE, 2004). As enzimas envolvidas nesse processo estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Enzimas envolvidas no processo de mosturação da cerveja com os correspondentes temperatura ótima de atividade enzimática ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH ótimo, substrato e produto.

<b>Enzimas</b>	<b>Temperatura ótima (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>pH ótimo na mosturação</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produto</b>
Hemicelulases	40 - 45	4,5 – 4,7	Hemicelulose	Glucanos
Endopeptidases	45 – 50	3,9 – 5,5	Proteínas	Peptídeos e aminoácidos livres
Exopeptidases	40 – 50	5,2 – 8,2	Proteínas	Aminoácidos livres
$\alpha$ -amilase	65-75	5,6 – 5,8	$\alpha$ -glucanos de baixo e alto peso molecular	Dextrinas
$\beta$ -amilase	60 – 65	5,4 – 5,6	$\alpha$ -glucanos	Maltose
Dextrinase Limite	55 – 65	5,1	Dextrina limite	Dextrina

Fonte: Adaptado de Tschöpe (2001).

O amido deve ser hidrolisado a sacarídeos menores, principalmente glicose, maltose, maltotriose, e dextrinas limites. Uma efetiva hidrólise do amido é essencial para uma ideal nutrição do micro-organismo, para uma elevada eficiência do processo e para uma adequada qualidade sensorial (KUNZE, 2004). A presença de resíduo de amido não degradado leva à turbidez na bebida (MIEDL; GARCIA; BAMFORTH, 2005). Durante a mosturação, para avaliar se ainda há presença de amido, se realiza o teste de amido com lugol (solução de iodo). Caso haja amido,



este se complexará com o iodo e a solução adquirirá coloração púrpura intensa. Caso ainda se tenha dextrinas a solução ficará rósea. Em caso negativo para presença destes dois polissacarídeos a solução não irá alterar sua coloração (KUNZE, 2004).

Como descrito por Kunze (2004), a degradação do amido ocorre em três etapas: (i) gelificação; (ii) liquefação e (iii) sacarificação. Em solução aquosa quente, água é incorporada ao grânulo de amido. Isso leva a aumentar o seu volume e, conseqüentemente, a inchar e estourar. Este processo físico é denominado de gelificação. A viscosidade da solução aumenta com esse processo. A liquefação do amido é um processo bioquímico, entendido como a diminuição da viscosidade da solução de amido gelificado pela ação da  $\alpha$ -amilase.

As longas cadeias de glicose que compõe o amido (amilose e amilopectina) são degradadas em cadeias menores pelas amilases. Todas as amilases são hidrolases glicosídicas e atuam nas ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídica. As  $\alpha$ -amilases são metaloenzimas de cálcio e agem em locais aleatórios ao longo da cadeia do amido (BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, 2004). Esta enzima hidrolisa os sacarídeos de cadeia longa em diferentes sacarídeos desde glicose até as dextrinases. A  $\beta$ -amilase atua a partir das extremidades não redutoras catalisando a hidrólise da segunda ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4, desta forma, liberando na solução duas unidades de glicose (maltose) de cada vez. A sacarificação do amido é a total degradação a glicose, maltose, maltotriose e dextrinas limites (não fermentescíveis). Estes açúcares são metabolizados pelas leveduras na seguinte ordem: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, sendo que altos níveis dos dois primeiros podem acarretar a repressão do metabolismo dos demais (KUNZE, 2004).

Ao longo da mosturação, a mistura de malte moído e água é submetida a rampas de aquecimento, na qual o tempo e a temperatura determinarão quais enzimas contidas no malte terão maior atuação e, assim, afetando diretamente a composição final do mosto (Tabela 6) (DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010).

### **2.6.3 Clarificação do mosto**

No final do processo de mosturação, o extrato encontra-se diluído em água, formando o mosto cervejeiro; mas ainda se faz presente a parte insolúvel do grão

(bagaço), a qual precisa ser separada. O bagaço é separado do mosto por meio da filtração, ou pela tina filtro, na qual utiliza-se a própria casca do malte como camada filtrante, ou por filtro prensa (KUNZE, 2004). A utilização de adjuntos não maltados pode levar ao aumento do teor de  $\beta$ -glucanos no mosto, consequentemente aumentando sua viscosidade e dificultando a filtração (GRUJIC, 1999; BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017). Ao término da filtração, são gerados entre 14 e 20 kg de bagaço de malte para cada hL de cerveja produzido. Este resíduo sólido recebe diversas destinações, como alimentação animal, produção de biogás, entre outros (MATHIAS; MELLO; SERVULO, 2014).

#### 2.6.4 Fervura do mosto

Após a filtração, o mosto é submetido à fervura. Esta etapa propiciará a inativação de enzimas, a coagulação proteica, a estabilização coloidal, a volatilização de DMS e compostos cetônicos e a desinfecção. Durante a fervura, é realizada a adição do lúpulo, permitindo a solubilização de seus óleos essenciais responsáveis por determinados aromas e a isomerização dos  $\alpha$ -ácidos em iso- $\alpha$ -ácidos. Após a isomerização estes ácidos tornam-se solúveis e apresentam impacto direto na intensidade de amargor da bebida. O momento da adição do lúpulo também influencia as características da cerveja, devido ao tempo da reação de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos. A adição feita no início da fervura confere um maior amargor, enquanto a adição tardia na fervura proporciona características de aroma devido à conservação dos óleos essenciais (KROTTENTHALER, 2009). Durante a fervura também ocorre o escurecimento do mosto e os responsáveis pelo fenômeno e pela cor final da bebida são os compostos gerados pelas reações de Maillard e de caramelização (BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, 2004; KUNZE, 2004).

Ao final, é realizado o processo de *whirlpool*; precipitam-se as proteínas desnaturadas juntamente com as resinas e taninos do lúpulo, que sedimentam para o fundo do tanque, formando o *trub* (BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, 2004; KUNZE, 2004). Geralmente, são gerados entre 200 e 400 g de *trub* úmido (de 80 a 90% de umidade) para cada hL de cerveja produzido (MATHIAS; MELLO; SERVULO, 2014).

### 2.6.5 Fermentação

Para se adicionar o inóculo e para a condução do processo fermentativo, o mosto este deve ser resfriado. O resfriamento do mosto é realizado, geralmente, por um trocador de calor de placas até atingir uma temperatura que seja possível fazer a inoculação da levedura. Embora as circunstâncias variem de mostos para mostos e de cepas para cepas, uma fermentação requererá em média 1 ppm de oxigênio dissolvido e  $10^6$  células/mL para cada 1ºP de extrato no mosto (DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010; MEDEIROS et al., 2018). Durante a fermentação, tem-se como variáveis fundamentais e que devem ser controladas a quantidade e vitalidade das leveduras, quantidade de oxigênio no mosto, teor de macro e micronutrientes, temperatura e o contato mosto-levedura (agitação) (KUNZE, 2004).

O mosto pode ser aerado por meio de injeção de oxigênio puro ou ar estéril no fermentador, ou ainda por agitação mecânica. A fermentação é conduzida em tanque fermentador com temperatura e pressão controlados até que a ação das leveduras diminua e que o mosto seja atenuado, ou seja, ocorra o consumo da fração fermentescível do extrato. A extensão máxima que a fermentação pode se suceder na presença de levedura pode ser avaliado pelo teste de atenuação limite. Esse ensaio envolve a utilização de uma elevada densidade de células e condições aeróbicas para a fermentação. Esse teste pode ser compreendido também como a quantidade de açúcares fermentescíveis presentes no mosto (KUNZE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006).

### 2.6.6 Maturação

Segundo a literatura (KUNZE, 2004; DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010), a maturação pode ser separada em duas fases, a fase quente e a fria. Na fase quente, pode-se manter o fermentador a temperaturas mais altas (em relação à temperatura de fermentação) para permitir a descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato em diacetil (2,3-butanodiona). A levedura então reduz o diacetil à produtos menos ativos e aromatizantes, a acetoína e o 2,3-butanodiol (Figura 1), sendo esse o passo limitante na maturação da cerveja. A adição de determinados adjuntos pode causar a diminuição da capacidade tamponante do mosto. Isto resulta em quedas

mais bruscas no valor do pH durante a fermentação e, conseqüentemente, em uma cerveja antes do processo de maturação (cerveja verde) com menor pH. Um baixo pH favorece a quebra do  $\alpha$ -cetolactato em diacetil e sua subsequente redução. A degradação do diacetil abaixo do seu limite de detecção sensorial é um dos pré-requisitos da maturação da cerveja. Desta forma, menores valores de pH podem diminuir o tempo de maturação necessário para a redução do diacetil (BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017).

A parte fria do processo visa melhorar a estabilidade coloidal da bebida, de modo que nenhuma turbidez se desenvolva ao longo do tempo. A baixas temperaturas ocorre a decantação da massa de levedura e dos complexos insolúveis de proteína e tanino que serão removidos pelo processo de filtração subsequente (DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010).

### **2.6.7 Acabamento e envase**

A clarificação torna a cerveja límpida e brilhante, podendo ser realizada por meio de sedimentação, uso de agentes clarificantes, centrifugação e filtração. A filtração mais comumente empregada é a filtração utilizando terra de diatomácea como agente filtrante. Esta tem a função de remover partículas em suspensão, principalmente leveduras, e substâncias de visual desagradável para a cerveja (como pectina, proteínas e resinas do lúpulo) (KUNZE, 2004; BAMFORTH, 2011). Durante a malteação, enzimas que degradam os componentes das paredes celulares, incluindo  $\beta$ -glucanos e arabinosilanos, são sintetizadas e ativadas. Devido à ausência dessas enzimas, maiores quantidades de  $\beta$ -glucanos estão presentes nos cereais não-maltados; conseqüentemente, uma maior quantidade destes componentes estará presente no mosto com adjuntos em comparação ao mosto puro malte. Como já descrito anteriormente, este fato pode causar problemas de produção na cervejaria, como um mosto mais viscoso e aumento do risco de turbidez na cerveja (BOGDAN e KORDIALIK-BOGACKA; 2017). São utilizados entre 1 g e 2 g de terra diatomácea por litro de cerveja clarificada (MATHIAS; MELLO; SERVULO, 2014). É gerado, então, um resíduo, também chamado de Lodo de *Kieselguhr*. Com a filtração ocorre um grande acúmulo de carga orgânica no filtro contendo terra diatomácea impedindo seu uso após sua saturação. Métodos de recuperação ainda não são capazes de regenerar totalmente a terra

diatomácea para sua reutilização (OLAJIRE, 2012; MATHIAS; MELLO; SERVULO, 2014).

Na etapa de acabamento, a cerveja tem sua carbonatação ajustada, processo que força a dissolução de gás carbônico no líquido por meio de pressão. Em seguida, esta segue para o envase que pode ser em garrafa, lata ou barril e, então, pode ser pasteurizada (cerveja) ou não (chope) (DRAGONE; ALMEIDA e SILVA, 2010).

## 2.7 Planejamento experimental

Conforme a literatura (MONTGOMERY, 2004; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), pesquisas científicas em diversos campos utilizam experimentos para descobrir e validar conhecimentos. Experimentos podem ser entendidos como uma prova ou série de provas em que modificações determinadas nas variáveis de entrada de um processo ou sistema são realizadas para observar e identificar as mudanças e a correspondente intensidade nas variáveis de saída. Neto, Scarminio e Bruns (2010) propõem as seguintes etapas para o desenvolvimento de um planejamento de experimentos: caracterização do problema, escolha dos fatores de influência e níveis, seleção das variáveis de resposta adequadas, determinação de um modelo de planejamento de experimentos, condução dos experimentos, análise dos dados, conclusões e recomendações. Na biotecnologia industrial, este artifício desempenha um papel fundamental no desenho de novos produtos, no desenvolvimento de processo de manufatura e melhora de processos (SCHMIDELL; LIMA; AQUARONE, 2001). O planejamento experimental permite economia de tempo e recurso nas pesquisas (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Em boa parte dos experimentos, dois ou mais fatores interferem na variável de estudo. Nestes casos, o planejamento experimental fatorial é o mais indicado, uma vez que se entende que, em cada ensaio completo do experimento, se avalia todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores (MONTGOMERY, 2004). Pode-se definir efeito como a mudança na resposta produzido por uma mudança no nível do fator. Um fator pode ser estudado em diferentes níveis. No caso em que se considera dois níveis, estes são denominados de menor (-) e maior (+) (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O delineamento composto central é constituído por três partes: (i) pontos fatoriais que permitem estimar os efeitos de primeira ordem; (ii) pontos axiais, fixados a uma distância  $\alpha$  a partir da origem para gerar os termos quadráticos e (iii) pontos centrais para proporcionar informações sobre a existência da curvatura no sistema, a variância da resposta prevista e fornecer uma estimativa independente do erro experimental (MONTGOMERY, 2004)

Como abordado por Neto, Scarmino e Bruns (2010), a metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais. Esta metodologia apresenta duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Com a finalidade de atingir a região ótima da superfície, repete-se essas etapas quantas vezes necessário. A etapa de modelagem é feita ajustando-se modelos simples (geralmente, lineares ou quadráticos) às respostas obtidas no planejamento fatorial ou no planejamento experimental ampliado. O deslocamento ocorre sempre ao sentido de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

## 2.8 Avaliação sensorial

Segundo Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008), a análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos. O estímulo é medido por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos. Conforme Briggs e colaboradores (2004), o prazer de beber cerveja pode estar relacionado a diferentes aspectos da bebida, como o conteúdo alcoólico, o valor nutritivo, a cor, a ausência de turbidez, a formação e manutenção de espuma, entre outros. Os autores enfatizam que o sabor e o aroma são os aspectos que realmente determinam a aceitabilidade da cerveja.

Como abordado por Bamforth (2017), os cervejeiros precisam ter especificações claras dos seus produtos. Enquanto isto pode ser parcialmente obtido por meio de parâmetros de análise físico-químicas, tais como a teor de álcool, o valor de pH, a cor, entre outros. Taylor e Organ (2009) destacam o uso de perfis sensoriais detalhados pela análise de especialistas, o que fornece um conhecimento fundamental sobre o sensorial do produto. A implantação de

programas de análise sensorial em cervejaria contribui, direta ou indiretamente, para a qualidade do produto, o sucesso da marca, a lealdade do consumidor e, finalmente, a confiabilidade da empresa(TAYLOR; ORGAN, 2009).

Segundo Teixeira (2009), as sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, a extensão, a duração, a qualidade, o gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado. Os métodos afetivos consistem na manifestação subjetiva dos provadores, pois não usam apenas das sensações proporcionadas pelos sentidos, mas também a sua memória afetiva. Esta forma de análise é capaz de demonstrar se tal produto agrada ou desagrade, se é aceito ou não. Por decorrer de uma manifestação pessoal, esses testes são os que apresentam maior variabilidade nos resultados, sendo mais difíceis de serem interpretados. Araujo, Silva e Minim (2003) atribuem importância às provas de análise descritiva quantitativa e teste de aceitação para conhecer os aspectos do produto e a intenção de compra pelo consumidor. Também segundo Teixeira (2009), a aceitação de um produto varia com os padrões de vida e base cultural e demonstra a reação do consumidor diante de vários aspectos, como, por exemplo, o preço, e não somente relacionada ao painel sensorial. Dessa forma, por se tratar de um produto comercializável, além dos atributos sensoriais, é importante ser avaliada a intenção de compra.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo contribuir para o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de cervejas utilizando adjuntos não convencionais, neste caso, empregando farinha de castanha portuguesa.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar o processo de pré-tratamento da farinha de castanha portuguesa e realizar a otimização dos parâmetros temperatura, tempo, proporção de malte e proporção de água.
- Produzir em escala laboratorial cervejas *ale* com 30% e 45% de castanha portuguesa no extrato primitivo e acompanhar os parâmetros da fermentação.
- Realizar a avaliação sensorial das cervejas obtidas nesta escala.
- Ampliar a produção da cerveja selecionada em escala de bancada, reproduzir na escala piloto e acompanhar os parâmetros da fermentação.
- Avaliar sensorial e físico-quimicamente a cerveja obtida em escala piloto.



## 4 Materiais e métodos

Figura 3 - Fluxograma das atividades desenvolvidas durante o projeto.



Fonte: Próprio autor.

Os experimentos desenvolvidos no projeto seguiram as etapas de (i) caracterização da castanha portuguesa, (ii) análise preliminares, (iii) planejamento

experimental e otimização do tratamento da castanha portuguesa, (iv) produção da cerveja em escala de bancada, (v) análise sensorial da cerveja na escala de bancada, (vi) produção da cerveja em escala piloto, e (vii) análise sensorial da cerveja produzida em escala piloto, representados esquematicamente na Figura 3.

## 4.1 Materiais

### 4.1.1 Água

A água a ser utilizada, tanto para limpeza quanto para obtenção da cerveja, era proveniente do poço artesiano localizado na Escola de Engenharia de Lorena (Lorena - SP). A água é canalizada até o processo e apresenta características físico-químicas adequadas à um bom processo cervejeiro (Anexo 1), e está de acordo com o padrão de qualidade apresentado na literatura correspondente (EUMANN; SCHILDBACH, 2012).

### 4.1.2 Malte

O malte utilizado nos experimentos é do tipo *Pilsen*, doado pela Maltearia Soufflet Brasil Ltda de Taubaté – SP, conforme laudo de análise apresentado no Anexo 1. O produto foi fornecido em sacos com capacidade de 50 kg e foi armazenado em câmara fria a 5°C.

### 4.1.3 Lúpulo

O lúpulo a ser utilizado é da variedade Zeus (13,9% alfa ácidos) em *pellets* tipo 90, armazenados sob refrigeração (4 °C). Este lúpulo é de variedade amarga, mas também pode ser utilizado como aromático, conferindo aroma cítrico. Este foi gentilmente doado pela AmBev, unidade de JACAREÍ - SP.

#### 4.1.4 Castanha portuguesa (FCP)

A farinha de castanha portuguesa (FCP) a ser utilizada no projeto foi gentilmente doada por um produtor da cidade de São Bento do Sapucaí – SP, por intermédio da Prof<sup>a</sup> Marite Carlin Dal’ostolo do IFSP - São Roque. De acordo com relato pessoal do produtor, a produção da FCP foi realizada conforme o Boletim Técnico do CATI (BUENO et al., 2018) para farinha de castanha moída *in natura* com película (informação verbal). As amostras permaneceram estocadas em câmara fria a 5 °C.

#### 4.2 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa US 05 da Fermentis® (FERMENTIS DIVISION OF S.I. LESAFFRE, 2017). Esta é de alta fermentação ou tipo *ale*.

#### 4.3 Procedimentos gerais mosturador automático

Os ensaios realizados nesta escala foram conduzidos em um mosturador de bancada marca Lochner Labor + Technik, modelo LB Eletronic, com 4 cubas de mosturação de capacidade de 500 mL cada. Para este equipamento era realizada a moagem fina e seca dos grãos de malte de cevada em moinho de disco. O pH inicial dos processos foi ajustado para 5,2 com ácido fosfórico, fabricante Synth, 85% de pureza. O banho-maria foi aquecido na velocidade de 1 °C/min até atingir a temperatura de mosturação de 67°C. A sacarificação foi avaliada qualitativamente pelo teste de iodo, com solução de Lugol (0,2N), como descrito em EBC-analytica (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005). Para o *mash-out* a temperatura era elevada a 80°C (taxa de aquecimento de 1 °C/min) e mantida por 10 minutos. O bagaço gerado era lavado duas vezes com volumes iguais (75 mL) de água a 80 °C.

## 4.4 Caracterização da Farinha de Castanha Portuguesa

### 4.4.1 Granulometria por tamisação

Para a determinação da granulometria da FCP foi realizada a peneiração até peso constante em cada uma das peneiras sobrepostas em um peneirador Produtest®. As telas utilizadas para classificações granulométricas foram: 1700 µm, 860 µm, 425 µm, 212 µm, 106 µm e base (fundo). Análise realizada em duplicata. Os valores de produto retidos em cada uma das telas foram utilizados para a elaboração da curva granulométrica.

### 4.4.2 Determinação da temperatura de gelificação do amido

A temperatura de gelificação do amido da farinha de castanha portuguesa foi determinada por Calorimetria Exploratória Diferencial (*DSC*). A FCP foi dissolvida em água deionizada na proporção 1:3 (FCP:Água) em massa. Então, 18 mg da mistura foram acondicionados e lacrados hermeticamente em um cadinho de alumínio. A análise foi realizada no equipamento *DSC TA Instruments*, modelo Q20, na faixa de temperatura de 40 °C a 120 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

### 4.4.3 Extrato da FCP

O extrato da farinha de castanha portuguesa como adjunto de malte foi determinado de acordo com a metodologia 6.3 da *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005). Em linhas gerais, o procedimento envolve a gelificação do amido do adjunto (20 g) por fervura com malte (5 g) por 30 minutos. A mistura é resfriada a 45°C e adiciona-se mais 25 g de malte de cevada para se realizar a mosturação. O procedimento foi realizado no mosturador automático como descrito no item 4.3.

#### 4.5 Metodologia de otimização do pré-tratamento da FCP

Para realizar a otimização do processo de pré-tratamento da FCP foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (Figura 3). Inicialmente, foram realizados experimentos prévios com um único fator (temperatura) em cinco níveis. Em cada ensaio, apenas esta variável independente era estudada e as outras eram fixadas. Após a análise das primeiras análises preliminares, estes resultados foram considerados para o segundo passo dos estudos prévios. Foi fixado um valor da primeira variável estudada (temperatura) e foram realizados experimentos com um único fator (tempo) em três níveis para determinar o intervalo usado para as quatro variáveis independentes. Com bases nesses resultados foi desenvolvido o DCCR para otimização do processo levando em consideração as respostas tempo de mosturação, extrato da FCP e atenuação limite. A metodologia prosseguiu conforme a Figura 3 com a elaboração do modelo matemático e a validação experimental do ponto ótimo.

##### 4.5.1 Seleção dos níveis do DCCR

O parâmetro de temperatura de pré-tratamento foi avaliado em 5 níveis, sendo eles 70, 75, 80, 85, 90 °C, com o mesmo tempo de pré-cozimento igual a 10 minutos, utilizando uma proporção de insumos/água de 1:3,5, e com 20% da massa total proveniente do malte de cevada (7,06 g) e 80% da FCP (35,30 g). Após pré-tratamento foi adicionado ao mesmo recipiente um mosto puro malte de cevada (22,2 g) para se obter mosto com 45% do extrato primitivo proveniente da castanha e o restante do malte de cevada. A mosturação de todos os ensaios foi realizada conforme item 4.3. Após a hidrólise do amido, o mosto era filtrado e sua massa ajustada para 300 g. Os testes foram realizados em triplicata.

As respostas avaliadas foram o tempo de mosturação, extrato da FCP e atenuação limite. O tempo de mosturação foi verificado, após os 45 minutos iniciais, em intervalos de 5 minutos com lugol para avaliar a presença de amido, conforme a *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005). O extrato da FCP foi adaptado da metodologia 6.3 da *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005). O teste de atenuação limite foi realizado conforme Djamed e colaboradores (DJAMEH et al., 2015). Para tal, uma amostra do mosto (250 g) tinha sua

concentração de extrato primitivo ajustado a cerca de 12°P e levada a ebulição em um erlenmeyer por 10 minutos, resfriada à temperatura ambiente e o peso retornado aos 250 g iniciais com água destilada. O extrato era determinado e o mosto transferido para um fermentador de 500 ml (PET). O fermento de cervejeiro liofilizado (1 g) foi adicionado ao mosto. Os frascos de fermentação foram equipados com *air-locks* (fechaduras de fermentação cheias de água para evitar entrada de ar atmosférico) e deixadas para fermentar à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). O mosto de fermentação foi agitado periodicamente em intervalos de 12 horas. O extrato residual do mosto (açúcares não fermentáveis) foi determinado após 72 horas de fermentação, e após em intervalos de 3 horas até que o valor se tornasse constante. O extrato primitivo e o residual foram determinados de acordo com o método 218/IV Bebidas fermento-destiladas – Extrato seco ou resíduo seco (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). A atenuação limite, que é a porcentagem de açúcar fermentável no extrato total, foi calculada conforme a equação de Grau Real de Fermentação (Equação 1):

$$GRF (\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

A segunda etapa envolveu o estudo do tempo. Este parâmetro foi avaliado em 3 níveis, sendo eles 10, 20 e 30 min. A temperatura empregada foi de 80°C, as demais variáveis independentes permaneceram fixas e se prosseguiu com os mesmos procedimentos da primeira etapa.

#### 4.5.2 Planejamento experimental e análise estatística

A metodologia de superfície de resposta com um delineamento composto central rotacional, como descrito por (MYERS; MONTGOMERY, 2002), foi utilizada para determinar a influência dos fatores sobre as variáveis respostas do processo de pré-tratamento. As variáveis independentes examinadas foram temperatura ( $X_1$ ), tempo ( $X_2$ ), proporção de malte ( $X_3$ ) e proporção de malte sobre as repostas extrato da FCP ( $Y_1$ ) tempo de mosturação ( $Y_2$ ) atenuação limite ( $Y_3$ ). Cada variável independente foi codificada em cinco níveis, com pontos axiais a uma distância  $\alpha$

de  $\pm 2,00$  (Tabela 7). Os pontos fatoriais ( $2^4$ ), axiais, e centrais estão representadas na Tabela 8.

Tabela 7 - Níveis das variáveis independentes a serem consideradas no planejamento experimental fatorial fracionado: temperatura ( $X_1$ ), tempo de pré-cozimento ( $X_2$ ), proporção de malte ( $X_3$ ) e relação insumo:água ( $X_4$ ).

Fatores	Código	níveis				
		-2	-1	0	1	2
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$X_1$	70	75	80	85	90
Tempo (min)	$X_2$	0	5	10	15	20
Proporção de malte (%)	$X_3$	0	10	20	30	40
Insumos:água	$X_4$	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5

Fonte: Próprio autor

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para minimizar os efeitos de variação inesperada nas variáveis resposta. O procedimento do experimento foi o mesmo do apresentado no item 4.5.1, porém com os parâmetros de processo definidos conforme a Tabela 8. Para determinar a aleatoriedade da ordem do experimento, este foi elaborado pelo programa *Design-Expert* (7.0.0).

O modelo matemático de regressão polinomial de segunda foi proposto de acordo com Myres e Montgomery (2002), Equação 2, também pelo programa *Design-Expert* 7.0.0.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \beta_{ji} X_i X_j \quad (2)$$

Em que:  $Y$  é a resposta prevista,  $\beta_0$  é o coeficiente de interseção,  $\beta_i$  é o coeficiente do efeito linear,  $\beta_{ii}$  é o coeficiente do efeito quadrático,  $\beta_{ij}$  é o coeficiente do efeito de interação,  $X_i$  e  $X_j$  variáveis independentes codificadas, e  $n$  é o número de fatores. A qualidade do ajuste da equação do modelo polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ),  $F_{\text{calculado}}$ , falta de ajuste e coeficiente de variação (CV). A significância estatística dos termos do modelo foi determinada por análise de regressão múltipla, análise de variância e teste de significância usando o programa *Design-Expert* (7.0.0).

Tabela 8 - Matriz (valores codificados) do delineamento composto central rotacional.

Ordem Padrão	Ordem dos experimentos	Fatores			
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	17	-1	-1	-1	-1
2	5	1	-1	-1	-1
3	7	-1	1	-1	-1
4	16	1	1	-1	-1
5	6	-1	-1	1	-1
6	15	1	-1	1	-1
7	4	-1	1	1	-1
8	14	1	1	1	-1
9	13	-1	-1	-1	1
10	3	1	-1	-1	1
11	9	-1	1	-1	1
12	11	1	1	-1	1
13	1	-1	-1	1	1
14	2	1	-1	1	1
15	10	-1	1	1	1
16	12	1	1	1	1
17	22	-2	0	0	0
18	25	2	0	0	0
19	20	0	-2	0	0
20	21	0	2	0	0
21	24	0	0	-2	0
22	23	0	0	2	0
23	27	0	0	0	-2
24	26	0	0	0	2
25	18	0	0	0	0
26	8	0	0	0	0
27	19	0	0	0	0

Fonte: Próprio autor.

### 4.5.3 Otimização

Para otimizar os parâmetros do processo de pré-tratamento da FCP foi aplicada a técnica de otimização numérica do programa *Design-Expert* (7.0.0). Foi selecionado o alvo desejado a resposta (maximização), e as variáveis independentes foram mantidas dentro do intervalo dos pontos axiais ( $\pm 2,00$ ). Após a obtenção dos parâmetros otimizados estes foram aplicados ao processo de acordo com a mesma metodologia descrita no item 4.5.2. Os gráficos de superfície de resposta foram gerados pelo programa *Design-Expert* (7.0.0) e foram utilizados



para uma interpretação visual do efeito das variáveis independentes sobre as respostas.

#### 4.6 Preparo das cervejas

##### 4.6.1 Escala laboratorial

Os ensaios em escala laboratorial foram conduzidos em painéis de alumínio com capacidade para 20 L. Foram elaborados três mostos, um puro malte de cevada (branco), um contendo 30% e outro contendo 45% de castanha portuguesa em extrato primitivo, todos os mostos contendo 12°P com volume total de 17 L. O pré-tratamento da castanha portuguesa foi realizada conforme as condições otimizadas de temperatura de 90°C, tempo de cozimento igual a 20 min, proporção de malte de 40% m/m e proporção de água 1:1 m/m. Após esta etapa a mistura gelatinizada de FCP era resfriada a 45°C e, então, foi adicionado ao mesmo recipiente um mosto puro malte de cevada para se obter mosto com 45% de castanha portuguesa em extrato primitivo. A taxa de aquecimento foi controlada utilizando um termômetro e um cronometro a 1°C/min até a temperatura de mosturação de 67°C. Esta temperatura foi mantida até a sacarificação do mosto. A sacarificação foi avaliada com teste de lugol (0,2N), como descrito em EBC-analytica (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005). Para o *mash-out* a temperatura era elevada a 80°C (taxa de aquecimento de 1 °C/min) e mantida por 10 minutos. Os cálculos das massas de malte, FCP e quantidade de água utilizadas estão apresentados no Anexo 5.

Cada um dos mostos elaborados foi separado em fração de 5,0 L, uma triplicata para cada. As cervejas foram inoculadas com levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa US-05 da Fermentis®. Após hidratadas, conforme recomendações do fabricante, foi determinado o número de células utilizando câmara de Neubauer e os mostos inoculados a uma concentração inicial de células de 12 milhões de células/ml. As fermentações ocorreram em erlenmeyer de 6 L e a 18°C em geladeiras com controlador de temperatura. Após a fermentação se sucedeu a maturação, na mesma geladeira, a 0°C. Para o envase as cervejas foram

refermentadas na garrafa com adição de 6g/L de açúcar refinado. Foram utilizadas garrafas de vidro âmbar de 600 ml devidamente esterilizadas.

#### 4.6.2 Escala piloto

Os ensaios em escala piloto foram conduzidos na Planta Piloto de Bebidas da EEL, com capacidade de produção de 200L/batelada (Anexo 6). Foram preparados dois lotes, um puro malte de cevada (branco) e outro com 45% castanha portuguesa em relação ao extrato primitivo. Foi levado em consideração as características da planta piloto, representada esquematicamente no Anexo 6, e os parâmetros do processo de pré-tratamento ajustados o mais próximo possível das condições ótimas. Com isso, os parâmetros foram os mesmos do item 4.6.1 com exceção da proporção de água (1:1,5 m/m). As mesmas condições de mosturação foram empregadas.

Foi preparado um inóculo para cada fermentação a partir de levedura liofilizada comercial US-05 como descrito no item 4.6.2.1. Os mostos foram inoculados a taxa de 12 milhões de células/ml. A fermentação dos dois mostos elaborados ocorreu a 16°C. Após a fermentação a temperatura foi regulada para 4°C e o creme de levedura decantado no fundo cônico foi retirado. A cerveja foi filtrada com terra diatomácea. Com a cerveja filtrada, está teve a sua carbonatação ajustada com CO<sub>2</sub> a 2 bar. O envase foi realizado em garrafas de vidro âmbar de 600 ml devidamente esterilizadas.

##### 4.6.2.1 Preparo do inóculo

A partir da cultura estoque liofilizada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* US-05 foi pesado 1 g e reidratada em 10 ml de água destilada estéril. Este volume foi transferido para Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml do mosto correspondente diluído a 5 °P. O cultivo foi realizado sob agitação em incubadora refrigerada (CIENTEC) a 150 rpm e em temperatura ambiente ( $\pm 30$  °C). Em seguida, este volume de meio foi transferido para outro frasco Erlenmeyer de 4 L, contendo 1,8 L de mosto, na concentração 7 °P, totalizando 2 L. Posteriormente, o inóculo foi fracionado em dois erlenmeyers de 6 L, cada um com 3 L avolumado

com mosto de mesma concentração da anterior, em condições assépticas. O processo prosseguiu até se atingir número de células suficiente para inocular os correspondentes mostos. O volume final de cultivo foi mantido sob refrigeração para a decantação das células e retirado o sobrenadante e efetuada a contagem de células para determinar o volume a ser inoculado.

#### 4.7 Análise de qualidade físico-química das cervejas

Para as cervejas prontas, tanto em escala laboratorial quanto piloto, foram determinados a cor, o pH e o nitrogênio amino livre. As análises de cor foram realizadas de acordo com método 9.6 da *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005) sendo utilizado um volume de 5 mL de cada cerveja, centrifugadas a 4.150 x g por 10 minutos e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível (marca Shimadzu modelo UV-150-02) no comprimento de onda 430 nm, em cubetas de 1 cm. O pH das cervejas foi determinado conforme o método 9.35 da *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005) utilizando um pHmetro marca AKSO®, modelo AK90. O teor nitrogênio amino livre (*FAN*) das cervejas foi medido segundo o método 9.10 da *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005).

##### 4.7.1 Parâmetros cinéticos

Foram realizadas amostragens (35 mL) (nunca ultrapassando 10% do volume total) periodicamente a cada 12 horas. As amostras foram desgaseificadas em agitador dos tubos *vortex* por dois minutos. Em seguida, era realizado a centrifugação a 4.150 x g por 20 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado para quantificar o extrato real (°P) e a densidade (g/mL) das cervejas e dos mostos. O extrato real foi determinado de acordo com o método “218/IV Bebidas fermento-destiladas – Extrato seco ou resíduo seco” (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). A densidade foi determinada utilizando o densímetro portátil DMA 35 da Anton Paar®. O teor alcoólico foi calculado de acordo com Cutaia e colaboradores (CUTAIA; REID; ALEX SPEERS, 2009). A contagem do número de células em suspensão, expressa em células/mL, foi realizada em uma câmara de Neubauer

(1/400 mm<sup>2</sup> x 1/10 mm). A viabilidade celular foi determinada pelo método de coloração com azul de metileno, conforme Guldfeldt e Arneborg (1998). Foram misturados volumes iguais da suspensão de células e da solução de azul de metileno (0,1 g/l de azul de metileno e 20 g/l de acetato de sódio). A viabilidade celular representa o percentual de células não coradas.

Os parâmetros das fermentações de fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$  em g/g), produtividade volumétrica ( $Q_p$  em g/L.h) e grau real de fermentação (GRF, em %) foram calculados de acordo com Borzani (1986) utilizando as equações 3, 4 e 1 (item 4.5.1), respectivamente. E, a eficiência (%) (Equação 5) da fermentação que foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac para a maltose ( $Y_{p/s}$ -teórico = 0,538 g/g).

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t - t_0} \quad (4)$$

$$\eta = \frac{Y_{P/S} \text{ experimental}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \quad (5)$$

Em que:

$P_0$  e  $P$ : concentração de etanol inicial e final (g/L), respectivamente.

$S_0$  e  $S$ : concentração de extrato real inicial e final (g/L), respectivamente.

$t_0$  e  $t$ : tempo inicial e final (h), respectivamente.

$\eta$  = Eficiência (%).

$Y_{p/s}$  teórico = 0,538 g<sub>etanol</sub>/g<sub>maltose</sub>.

#### 4.8 Análise sensorial

A análise sensorial das cervejas foi realizada seguindo os critérios sugeridos pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). As análises foram realizadas na Planta Piloto de Bebidas da EEL em cabines individuais e iluminação branca. Os voluntários foram recrutados por intermédio de informativos

distribuídos no *campi* da EEL. Foram selecionados provadores maiores de 18 anos e que afirmaram ter o hábito de tomar cerveja.

As amostras foram servidas em copos plásticos transparentes e descartáveis, codificados com números aleatórios de três dígitos, contendo aproximadamente 50 mL de cerveja a temperatura de consumo 4 – 5 °C. Para os testes cada provador recebia as amostras de cerveja juntamente com um copo de água e um biscoito água e sal para limpar o paladar entre uma amostra e outra. O teste afetivo de aceitabilidade das cervejas foi realizado utilizando uma escala hedônica de nove pontos, em que 9 corresponde à “gostei extremamente” e 1 à “desgostei extremamente”, sendo 5 “nem gostei/nem desgostei”. A intenção de compra das bebidas foi avaliada em uma escala de cinco pontos. A ficha preenchida pelos participantes está representada no Anexo 3.

Os resultados foram compilados em uma única planilha. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e o teste de Duncan foi aplicado para identificar diferenças significativas entre as médias, utilizando o programa *Minitab* versão 18.1 (MINITAB, 2017). Diferenças entre as médias superiores a 5% foram consideradas significativas.

A etapa de análise sensorial foi aprovada pelo comitê de ética para sua execução (Número CAAE: 02907818.2.0000.5390) e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 4).

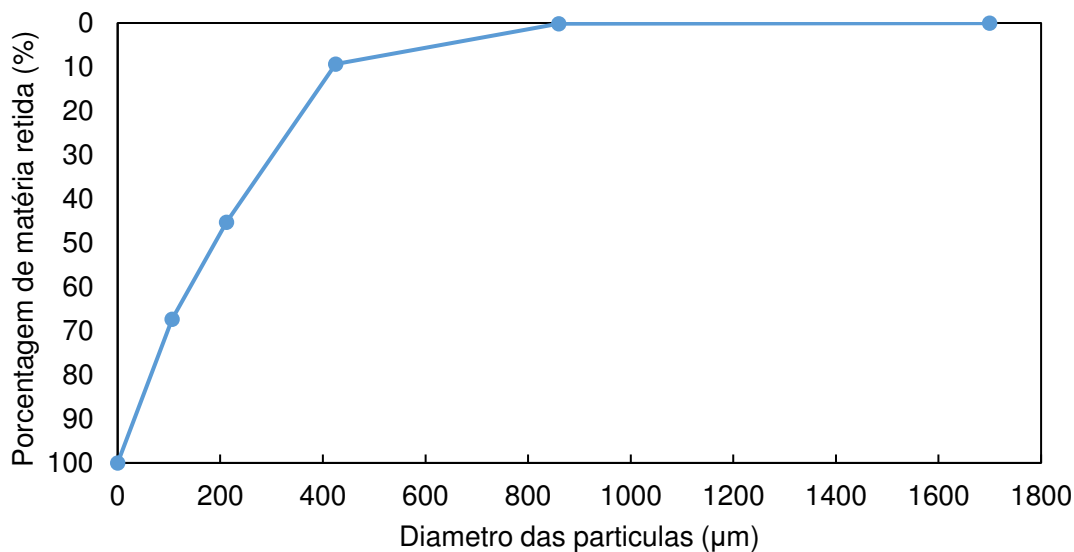
## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Caracterização da FCP

#### 5.1.1 Curva granulométrica da FCP

A granulometria da farinha de castanha portuguesa foi determinada por tamisação. A Figura 4 apresenta a porcentagem de material retido nas telas conforme a abertura de cada uma delas. Pode-se observar que mais de 90,0% das partículas apresentam diâmetro inferior a 425  $\mu\text{m}$  e que cerca de 55% inferior a 212  $\mu\text{m}$ . O conhecimento da distribuição granulométrica, entre outros parâmetros, garante a uniformidade da farinha.

Figura 4 - Curva da distribuição granulométrica da farinha de castanha portuguesa de acordo com a porcentagem de matéria retida.



Fonte: Próprio autor.

Como abordado ao decorrer da revisão bibliográfica (item 2), os adjuntos influenciam em todas as etapas do processo cervejeiro. A granulometria dos insumos é levada em consideração principalmente para a etapa de filtração do mosto realizadas na tina de filtração. As características das cascas do malte apresentam papel fundamental para formação da camada filtrante. De acordo com a literatura (STUBITS; TENG; PEREIRA, 1986; KUNZE, 2004), geralmente cerca

de 75% da massa seca do bagaço de malte após filtração é correspondente a casca do malte (cerveja puro malte de cevada). A fração ideal de cascas de malte presentes para formar uma camada filtrante depende de diversos fatores, desde a granulometria da moagem, tipo de filtração empregado, diâmetro e formato da abertura, entre outros. Em cervejas que, por diversos fatores, podem apresentar dificuldades na filtração devido à baixa quantidade de cascas de malte pode-se adicionar cascas de arroz para auxiliar o processo. Situações semelhantes ocorrem com adjuntos convencionais, a exemplo casos com alto teor de trigo (> 50%) resulta em filtração lenta na ausência de casca (BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, 2004).

### **5.1.2 Determinação da temperatura de gelificação da Castanha Portuguesa**

Foi determinada a temperatura de gelificação (TG) da FCP pela análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), e a temperatura de conclusão da curva endotérmica ( $T_c$ ) encontrada foi de 69,8°C. Este resultado ficou próximo dos resultados apresentados na literatura, compilados por Zhu (2017), apresentados na Tabela 4.

É possível se obter informações importantes com a determinação da temperatura de gelificação que não são triviais pelos estudos no mosturador automático. Por exemplo, como apresentado por Krottenthaler, Back e Zarnkow (2009), a TG do arroz que, a depender da variedade, se encontra no intervalo de 67 a 91°C. Nesse caso, a temperatura de pré-tratamento não necessariamente necessita ser acima de 90°C e esse fator é interessante sobre o ponto de economia energética. Em casos com adjuntos de malte com TG baixa o uso de enzimas exógenas pode até ser abandonado ou um processo de infusão direta pode ser realizado.

Porém, como abordado na literatura (KROTTENTHALER; BACK; ZARNKOW, 2009), adjuntos amiláceos com temperaturas de gelificação do seu amido entre 67 °C e 78 °C devem passar por uma etapa de pré-cozimento. Isso se deve ao fato de a gelificação do seu amido só ocorrer em temperaturas em que as enzimas do malte já se encontram desnaturadas. Dessa forma, estas não estão ativas no mosto para a liquefação e sacarificação e o amido gelificado permanece no meio, sendo identificado pelo teste do iodo.

A temperatura de gelificação do amido da espécie *C. sativa* difere da espécie *C. molíssima*. Este fato indica que os estudos realizados neste projeto poderão não abranger outras espécies de gênero *Castanea*, sendo necessários estudos para a aplicação a cada gênero. Este fato merece destaque, uma vez que apesar da espécie *Castanea sativa* ser a tradicionalmente cultivada, a espécie chinesa *Castanea molíssima* tem sua plantação em expansão no Brasil, e as castanhas de ambas espécies são comercializadas sob a mesma denominação de “castanha portuguesa” (BOSCO, 2012; BUENO; PIO, 2014; ZHU, 2017)

### 5.1.3 Determinação do extrato da FCP

A determinação do extrato da FCP foi realizado conforme a metodologia 6.3 da *EBC* (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005). Os resultados dos experimentos estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados dos ensaios para determinação do extrato da farinha de castanha portuguesa (% m/m).

Número do ensaio	Massa total de malte (g)	Massa total de FCP (g)	Massa do mosto (g)	Extrato mosto (% m/m)	Extrato FCP (%)
1	30,07	20,05	400,68	8,025	54,53
2	30,05	20,04	401,33	8,058	55,33
3	30,14	20,16	400,33	8,110	56,55
4	30,01	20,03	401,92	8,031	54,67

Fonte: Próprio autor.

As análises foram realizadas considerando malte de cevada com moagem fina a seco com rendimento de 81,0% e umidade 4,5% (anexo 2). A umidade da FCP foi determinada de acordo com o método “012/IV Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105°C” do Instituto Adolf Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008) e apresentou valor de  $9,4 \pm 0,1\%$  m/m. A média para o extrato nesta análise foi de  $55,3\% \pm 0,9\%$  considerando a massa úmida da FCP e extrato em base da massa seca igual a  $61\% \pm 1\%$ . Lembrando que esta é uma análise que deve ser realizada a cada lote como controle de qualidade uma vez que este é um parâmetro que sofre variações de safra para safra. Neste trabalho um único lote de FCP foi utilizado. Este resultado é importante para projetar as



formulações com a percentagem correta de açúcares extraídos da castanha no extrato primitivo, principalmente por ser um dos parâmetros regulamentados pela legislação.

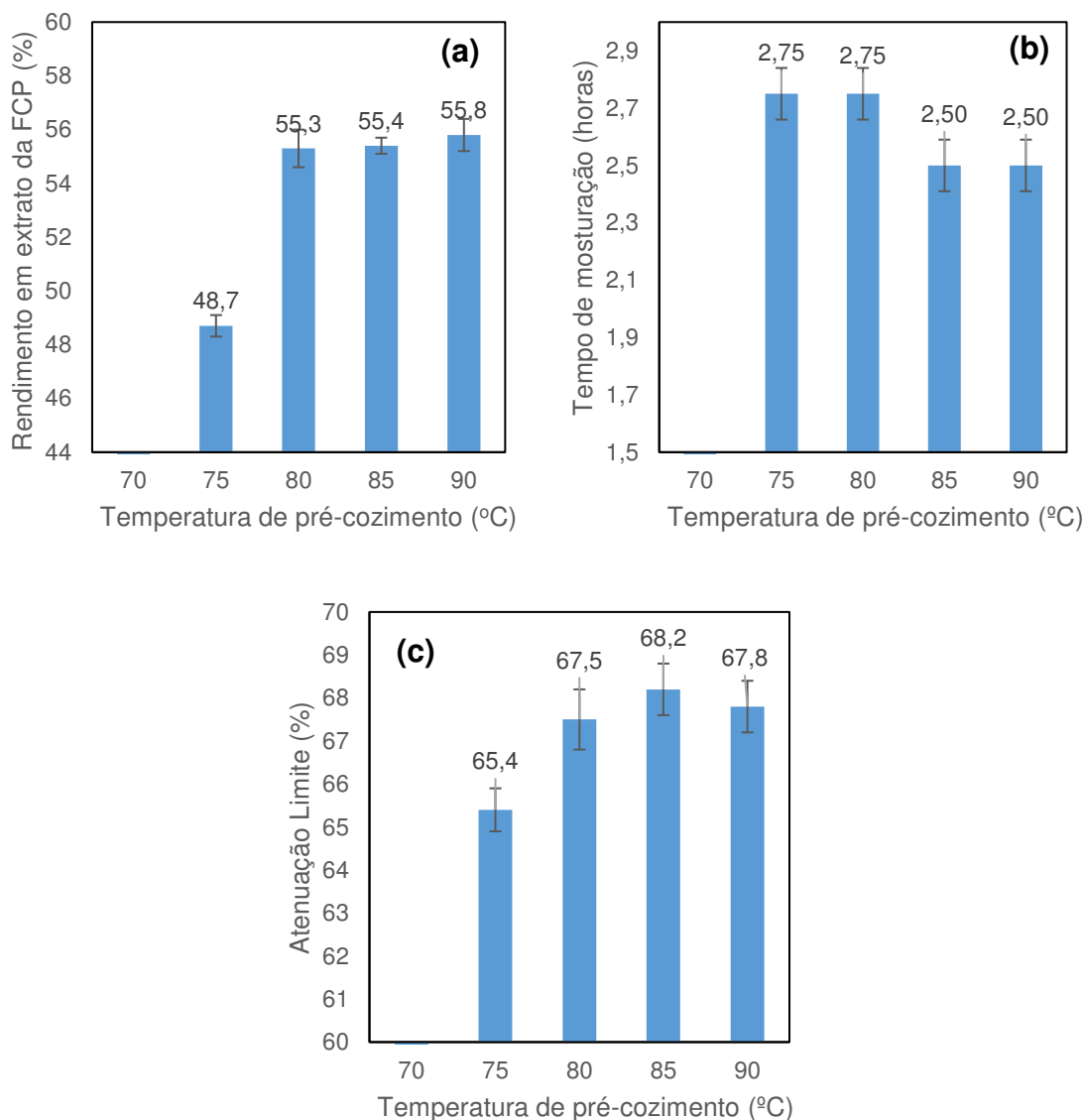
## 5.2 Otimização do tratamento da FCP

### 5.2.1 Seleção dos níveis dos fatores do DCCR

Foram conduzidos estudos prévios para selecionar os níveis dos fatores do DCCR para a otimização das variáveis do pré-tratamento da FCP. Todos os ensaios prévios e do planeamento experimental foram realizados com o teor mais elevado de adjunto permitido na legislação para denominar a bebida como “cerveja”, ou seja pelo menos 55% de malte de cevada, conseqüentemente 45% do extrato primitivo de castanha portuguesa. As mesmas condições de mosturação foram aplicadas em todos os ensaios. As respostas avaliadas foram o extrato da FCP ( $Y_1$ ), o tempo de mosturação ( $Y_2$ ) e a atenuação limite do mosto ( $Y_3$ ). Os experimentos iniciais consistiram em manter todas as condições de pré-tratamento (variáveis independentes) constantes, com exceção da temperatura que foi avaliada em 5 níveis (70, 75, 80, 85 e 90°C). Os resultados do estudo prévio da temperatura estão representados na Figura 5.

Foi possível realizar a sacarificação do amido da FCP com uma temperatura de pré-cozimento superior a 70°C, verificado qualitativamente pelo teste com lugol. Os resultados mostraram que a temperatura de pré-tratamento teve um efeito significativo sobre as três respostas avaliadas ( $p < 0,05$ ). Com relação ao extrato obtido da castanha portuguesa e da atenuação limite do mosto, não foi observado diferença estatística entre os ensaios a 80, 85 e 90°C e estes apresentaram resultados mais satisfatórios que os ensaios a 75°C. Desta maneira, o valor de 80°C por ser, a princípio, a temperatura mais branda entre as que apresentaram os resultados mais adequados foi mantida constante para o estudo prévio do tempo.

Figura 5 - Experimentos com um único fator demonstrando o efeito da temperatura sobre o extrato da FCP (a), tempo de mosturação (b) e atenuação limite do mosto (c).



As barras verticais representam o desvio padrão (triplicatas).

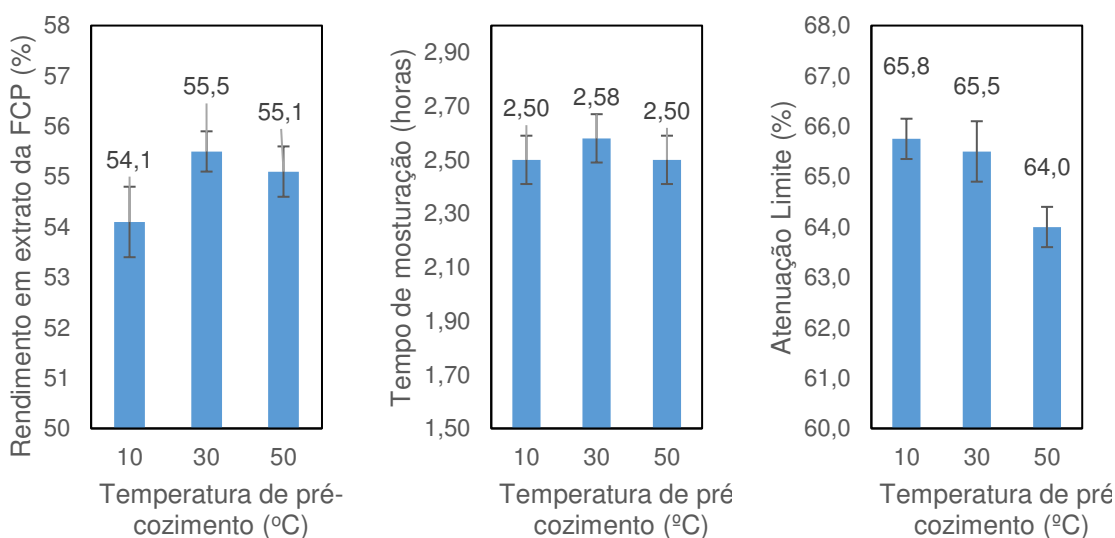
Fonte: Próprio autor.

De maneira análoga, realizada para a determinação da temperatura, o tempo de pré-tratamento térmico também foi estudado, porém em três níveis (10, 30 e 50 minutos). Os resultados do estudo prévio do tempo estão representados na Figura 6. Os valores obtidos para a resposta atenuação limite não apresentou diferença estatística entre os tempos 10 e 20 minutos. Entretanto, estes foram superiores ao encontrado a 50 minutos ( $p < 0,05$ ). Isso provavelmente ocorreu porque tratamentos térmicos prolongados ou com temperaturas elevadas podem alterar a estrutura do amido e torná-lo mais resistente (KUNZE, 2004). Apesar de não ter

sido possível notar diferença entre os valores de extrato, o tratamento térmico com maior tempo interferiu na fermentabilidade do mosto.

Estes resultados tornaram-se a base para elaborar o planejamento experimental em que os valores de temperatura (80°C) e de tempo (10 minutos) foram considerados como pontos centrais conforme descritos no item 4.5.

Figura 6 - Experimentos com um único fator demonstrando o efeito do tempo de pré-tratamento sobre o extrato da FCP (a), tempo de mosturação (b) e atenuação limite do mosto (c).



As barras verticais representam o desvio padrão (triplicatas).

Fonte: Próprio autor.

## 5.2.2 Metodologia superfície de resposta

A Tabela 10 mostra as condições experimentais, utilizadas no delineamento composto central rotacional (DCCR) e as correspondentes respostas obtidas de rendimento em extrato da FCP ( $Y_1$ ), tempo de mosturação ( $Y_2$ ) e atenuação limite ( $Y_3$ ). Observa-se que o extrato da FCP, o tempo de mosturação e a atenuação limite variaram nos intervalos de 48,1% a 58,9%, 155 a 240 minutos e 59,3% e 67,4%, respectivamente. O maior valor para atenuação limite (67,4%) ocorreu na condição  $X_1 = 85^\circ\text{C}$ ,  $X_2 = 15$  min,  $X_3 = 30\%$  e  $X_4 = 1:4$  (experimento n.º 8). A mosturação com menor tempo para sacarificação (155 minutos) ocorreu nas condições  $X_1 = 85^\circ\text{C}$ ,  $X_2 = 15$  min,  $X_3 = 10\%$  e  $X_4 = 1:4$  (experimento n.º 4). E, se obteve o resultado mais elevado para o extrato da castanha portuguesa (58,9%) nas condições  $X_1 = 80^\circ\text{C}$ ,  $X_2 = 0$  min,  $X_3 = 20\%$  e  $X_4 = 1:3$  (experimento n.º 19).

Tabela 10 - Matriz (valores codificados) do delineamento composto central rotacional e os resultados correspondentes de extrato da FCP ( $Y_1$ ), tempo de mosturação ( $Y_2$ ) e atenuação limite ( $Y_3$ ) do mosto.

Ordem Padrão	Ordem de execução	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$
1	17	-1	-1	-1	-1	54,0%	185	63,25%
2	5	1	-1	-1	-1	57,2%	175	66,50%
3	7	-1	1	-1	-1	56,0%	170	59,67%
4	16	1	1	-1	-1	57,2%	155	63,08%
5	6	-1	-1	1	-1	57,5%	180	64,25%
6	15	1	-1	1	-1	52,5%	160	66,42%
7	4	-1	1	1	-1	56,6%	165	65,67%
8	14	1	1	1	-1	52,0%	175	67,42%
9	13	-1	-1	-1	1	58,1%	165	65,42%
10	3	1	-1	-1	1	54,6%	185	64,00%
11	9	-1	1	-1	1	58,6%	170	62,50%
12	11	1	1	-1	1	53,2%	175	63,25%
13	1	-1	-1	1	1	57,0%	165	63,00%
14	2	1	-1	1	1	54,5%	165	63,08%
15	10	-1	1	1	1	55,3%	160	65,67%
16	12	1	1	1	1	52,0%	180	64,00%
17	22	-2	0	0	0	53,7%	240	64,67%
18	25	2	0	0	0	54,3%	180	66,00%
19	20	0	-2	0	0	58,9%	165	65,42%
20	21	0	2	0	0	52,5%	160	64,83%
21	24	0	0	-2	0	48,1%	240	59,33%
22	23	0	0	2	0	52,1%	180	64,25%
23	27	0	0	0	-2	55,5%	185	66,50%
24	26	0	0	0	2	56,5%	185	66,67%
25	18	0	0	0	0	50,0%	170	65,25%
26	8	0	0	0	0	52,1%	170	66,00%
27	19	0	0	0	0	54,1%	170	65,75%

$X_1$ : temperatura;  $X_2$ : tempo de pré-cozimento;  $X_3$ : proporção de malte;  $X_4$ : relação insumo:água;  $Y_1$ : rendimento em extrato da FCP;  $Y_2$ : tempo de mosturação;  $Y_3$ : atenuação limite.

Fonte: Próprio autor.

### 5.2.3 Composição do modelo

A partir da análise de regressão múltipla obtida pelo tratamento estatístico dos dados experimentais (Tabela 10), obteve-se um polinômio de segunda ordem em variáveis codificadas para a atenuação limite, representada pela Equação 6.

$$\begin{aligned}
 \text{At. Limite} = & 0,6541 + 0,0046X_1 + 0,0090X_3 - 0,0080X_1X_4 \\
 & + 0,0104X_2X_3 - 0,0067X_3X_4 - 0,0100X_3^2
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

Para avaliar se a equação obtida descreve a variabilidade das respostas foi realizado ANOVA e análise dos coeficientes de múltipla determinação (Tabela 11).

Tabela 11 - Análises de variância para o modelo quadrático da superfície de resposta: modelo de regressão estimado da relação entre as variáveis respostas e as variáveis independentes do pré-tratamento da FCP.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>calculado</sub>	p <sub>valor</sub>
<b>Modelo</b>	0,0086	6	0,0014	20,82	< 0,0001
X <sub>1</sub>	0,0005	1	0,0005	7,30	0,0137
X <sub>3</sub>	0,0020	1	0,0020	28,32	< 0,0001
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0,0010	1	0,0010	14,90	0,0010
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0017	1	0,0017	25,14	< 0,0001
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,0007	1	0,0007	10,30	0,0044
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,0027	1	0,0027	38,99	< 0,0001
<b>Resíduos</b>	0,0014	20	0,0001		
Falta de ajuste	0,0014	18	0,0001	5,15	0,1748
Erro puro	0,0000	2	0,0000		
Total (corr.)	0,0100	26			
R <sup>2</sup>	0,8620				
R <sup>2</sup> <sub>A</sub>	0,8206				
CV (%)	1,29				

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios, LK: falta de ajuste; CV: coeficiente de variação, X<sub>1</sub>: temperatura; X<sub>2</sub>: tempo de pré-cozimento; X<sub>3</sub>: proporção de malte; X<sub>4</sub>: relação insumo:água.

Fonte: Próprio autor.

A Tabela 11 apresenta os resultados do ajuste do modelo quadrático apresentado na Equação 6 aos dados. Os coeficientes tiveram sua significância estatística avaliada individualmente utilizando F-test e p-valor, em que sua significância aumenta conforme o valor de F calculado se torna maior e o valor de p-valor se torna menor. Observa-se uma falta de ajuste não significativa, um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 86,20% e um coeficiente de variação (CV) de apenas 1,29%. De acordo com Myers e Montgomery (1995), o coeficiente de variação (CV) pode ser utilizado para analisar a adequação dos modelos. O CV é a relação entre o erro padrão da estimativa e o valor médio da resposta observada,

expresso em porcentagem. De acordo com autores, um modelo pode ser considerado reprodutível razoavelmente se o valor para o CV não for superior a 10%.

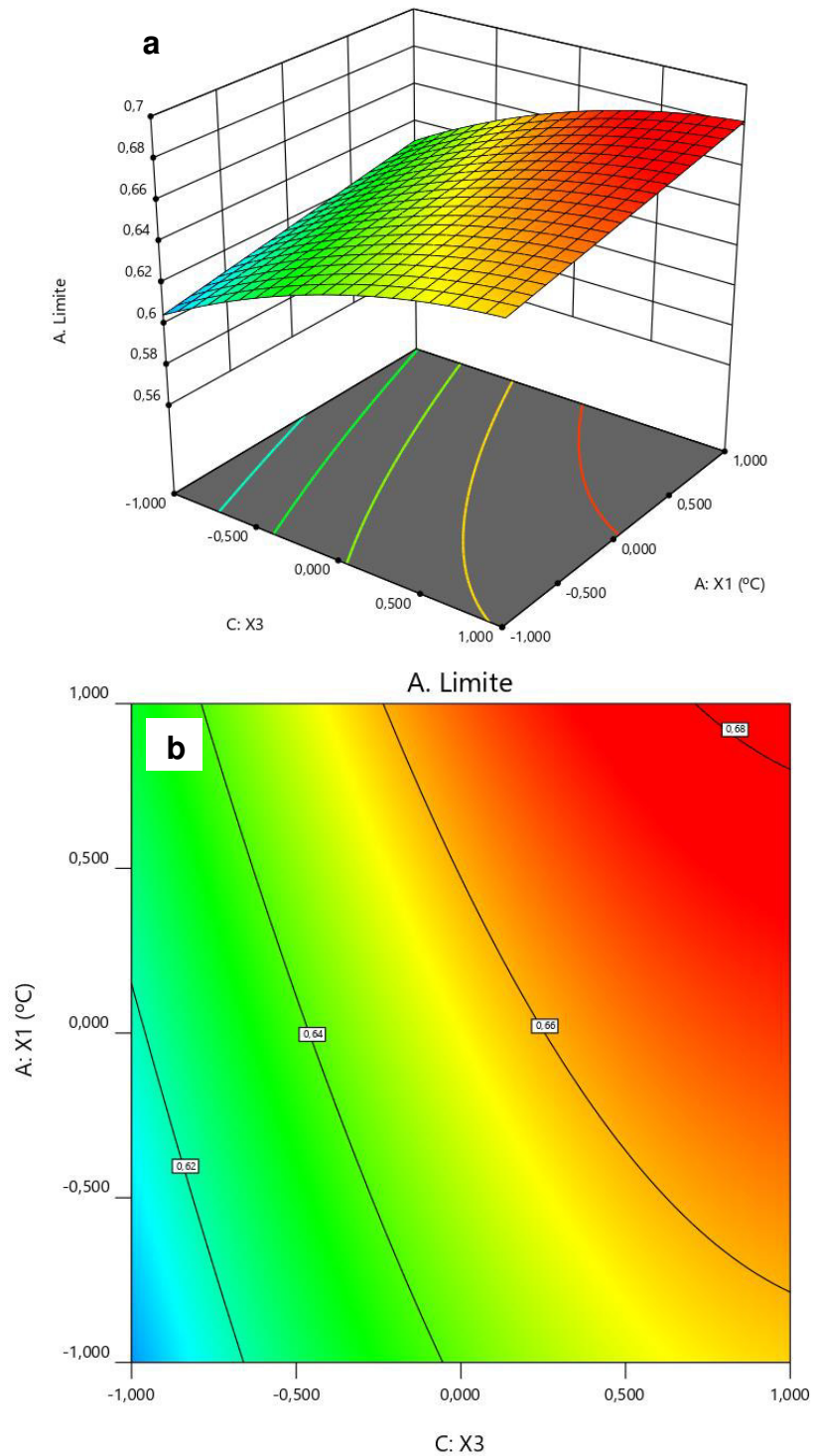
O valor de  $F_{\text{calculado}}$  igual a 20,82 indica uma elevada significância do modelo. Ao mesmo tempo, o  $p_{\text{valor}}$  inferior a 0,050 estabelece que os termos do modelo são estatisticamente significativos. Os termos  $X_2$  e  $X_4$  não são significantes ao modelo e, apesar de poderem ser mantidos para suportar a hierarquia, não foram considerados para evitar um *overfitting* do modelo. As interações  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  e  $X_2X_4$  não apresentaram efeitos sobre a resposta, assim como os termos quadráticos  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  e  $X_4^2$  ( $p > 0,05$ ). Um valor de  $F_{\text{calculado}}$  de 4,74 para a falta de ajuste do modelo infere que este não é significativo relativo ao erro puro. Ou seja, é improvável que este modelo ocorra aleatoriamente, por exemplo devido ao ruído dos dados.

No intervalo avaliado para as variáveis independentes, estas e as suas interações não apresentaram efeito estatisticamente significativos sobre as respostas rendimento em extrato da FCP ( $Y_1$ ) e tempo de mosturação ( $Y_2$ ). A equação em termos de fatores codificados pode ser usada para fazer previsões sobre a resposta para determinados níveis de cada fator além de ser útil para identificar o impacto relativo dos fatores, comparando os correspondentes coeficientes.

#### 5.2.4 Análise da superfície de resposta

A Figura 7a apresenta a superfície de resposta e a Figura 7b a curva de contorno do efeito das variáveis independentes temperatura ( $X_1$ ) e proporção de malte ( $X_3$ ) sobre a resposta atenuação limite. A temperatura apresentou efeito linear e a proporção de malte efeito quadrático.

Figura 7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a atenuação limite do mosto contendo castanha portuguesa em função da temperatura ( $X_1$ ) e da proporção de malte ( $X_3$ ).



$X_1$ : temperatura;  $X_3$ : proporção de malte;

Fonte: Próprio autor.

Observa-se que o valor da resposta aumenta, quanto maior a temperatura e quanto maior o incremento da proporção de malte empregada no pré-tratamento da FCP.

### 5.2.5 Validação experimental do ponto ótimo

Com base na equação 6, obtida para a atenuação limite com o planejamento experimental, foi realizado a otimização numérica para maximizar esta resposta. De acordo com o programa *Design-Expert*, para obter o valor máximo para a atenuação limite (74,1%) as condições ótimas para as variáveis independentes foram estimadas na temperatura de 90°C, 20 minutos de pré-tratamento, 40 % em massa de malte e na proporção de água de 1:1 (m/m). Para confirmar experimentalmente o resultado da otimização numérica, usaram-se as condições ótimas, oferecidas pelo programa, em experimentos adicionais (triplicata). Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os valores previstos e experimentais (Tabela 12), portanto o modelo está validado.

Tabela 12 - Valores obtidos experimentalmente e valores preditos para a resposta atenuação limite sob condições ótimas.

Resposta	Condições ótimas	Valor experimental	Valor previsto
Atenuação limite (%)	X1 = 90°C X2 = 20 min X3 = 40 % X4 = 1:1	73,8 ± 0,7	74,1

X1: temperatura; X2: tempo de pré-cozimento; X3: proporção de malte; X4: relação insumo:água.

Fonte: Próprio autor

Conforme Kunze (2004), a mosturação consiste na atividade enzimática seguida pela dissolução do extrato (substâncias solúveis) no mosto cervejeiro. As diferentes condições empregadas na mosturação afetam diretamente a fermentabilidade e, conseqüentemente, o valor da atenuação limite do mosto. Lembrando que a atenuação limite representa a extensão máxima que a fermentação pode se suceder na presença do agente de fermentação. Desta forma, as diferenças encontradas nos valores desta resposta refletem o quanto do extrato foi passível de assimilação pela levedura somente devido ao efeito do pré-



tratamento, uma vez que foi considerado o mesmo procedimento de mosturação para todos os ensaios.

As condições ótimas, validadas experimentalmente, obtidas neste trabalho são de caráter inédito com relação a castanha portuguesa na literatura para elaboração de bebidas.

### 5.3 Produção de cerveja em escala de bancada

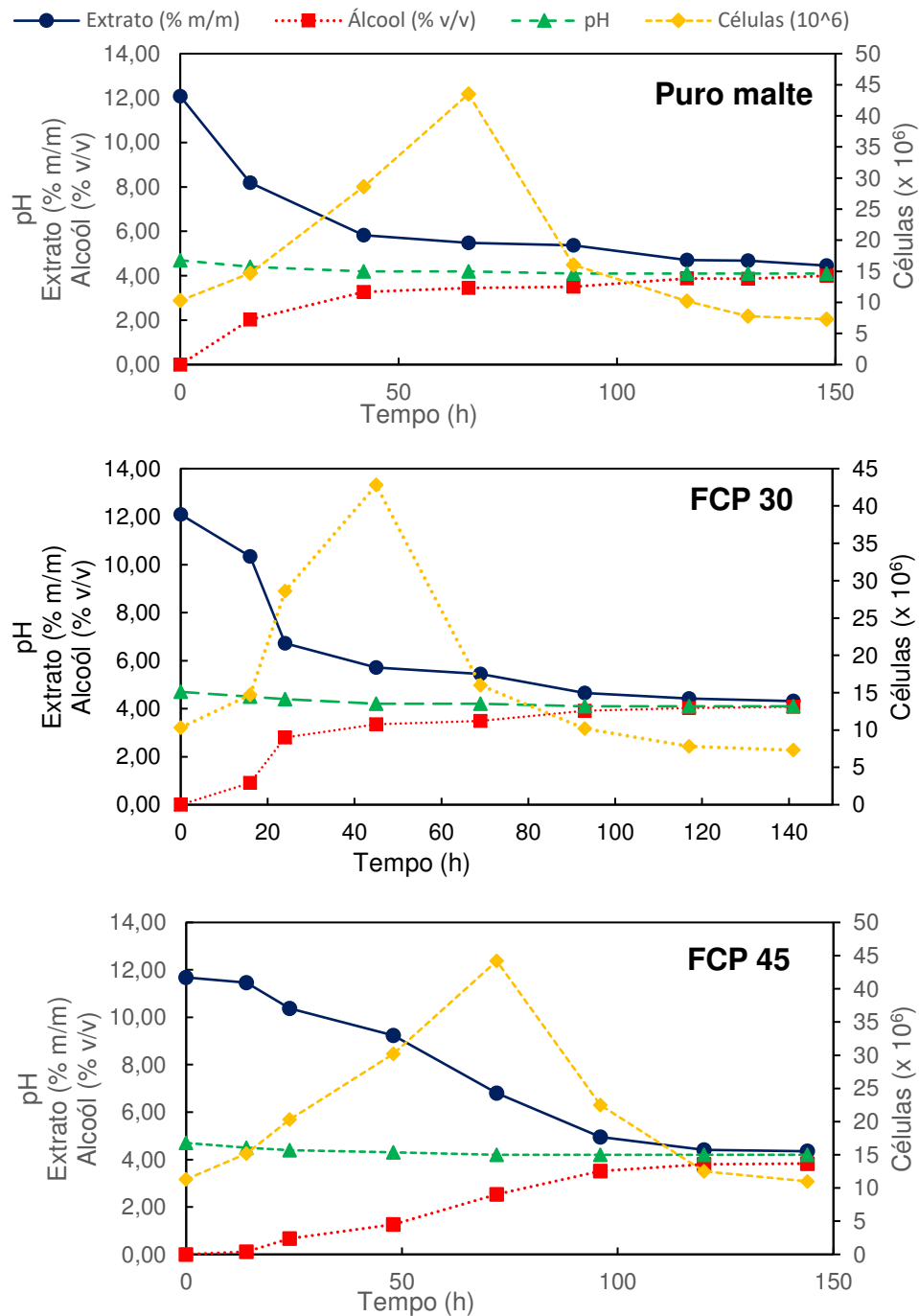
Foi realizada em triplicata a produção de cerveja com castanha portuguesa em escala de laboratório (5 L) na Planta Piloto de Bebidas da Escola de Engenharia de Lorena. Foram seguidas as condições otimizadas, e validadas experimentalmente, descritas no item 5.2. Foram elaborados mostos cervejeiros contendo 30% e 45% do extrato proveniente da FCP, denominados de FCP 30 e FCP 45 respectivamente. Igualmente, produziu-se uma cerveja puro malte de cevada sob as mesmas condições experimentais, utilizada como controle.

No decorrer das fermentações foram acompanhados os parâmetros de concentração de extrato (% m/m), teor de álcool (% v/v), pH e número de células em suspensão com a finalidade de ser realizado um estudo fermentativo. A evolução dos parâmetros em função do tempo (horas) está representada graficamente na Figura 8 respectivamente para as três fermentações realizadas, FCP 30, FCP 45 e branco puro malte.

Ao longo das fermentações a viabilidade celular manteve-se elevada, decaindo somente ao final e atingindo valores ao redor de 95%. Todas as fermentações apresentaram concentrações celulares iniciais em torno de  $12 \times 10^6$  células/ml. O crescimento celular foi mais rápido durante a fase inicial apresentando o máximo de número de células em suspensão em torno de 45 horas de fermentação para o mosto puro malte e para a FCP 30, enquanto para a FCP 45 o ponto máximo ocorreu as 72 horas. O crescimento celular é mais intenso no início da fermentação devido a presença de oxigênio dissolvido, prevalecendo o metabolismo de respiração celular. Mesmo durante a fase de maior crescimento celular é possível observar ligeira produção de etanol (álcool % v/v), mesmo com presença de oxigênio, devido ao efeito Crabtree (BOULTON; QUAIN, 2006). Após o ponto máximo de concentração celular verifica-se um decaimento. Este fenômeno ocorre devido a sedimentação das leveduras à medida que as concentrações de

substrato e nutrientes do meio vão se tornando menos favoráveis, ao mesmo tempo que vai incrementando o acúmulo de produtos, por exemplo resultando em um menor pH e maior concentração alcóolica no meio.

Figura 8 - Concentração do extrato real do mosto, da concentração celular, da concentração de etanol e do pH em escala bancada para os mostos puro malte, FCP 30 e FCP 45.



Fonte: Próprio autor

A Tabela 13 apresenta os parâmetros cinéticos e de análises físico-químicas entre as bebidas fermentadas em escala de laboratório. Com relação aos parâmetros teor alcoólico, fator de conversão de substrato em produto, produtividade volumétrica e grau real de fermentação (GRF), observa-se que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada mosto pelo programa *Minitab* 18.0.1. No entanto, a presença da FCP na elaboração dos mostos tornou a coloração das cervejas mais intensa alterando a cor do mosto puro malte de cevada de amarelo dourado (11 EBC) para um acobreado claro (26 EBC), segundo a escala de coloração de cervejas pelo guia BJCP (STRONG; ENGLAND, 2015). O mosto elaborado com FCP também apresentou, como esperado, menor teor inicial de FAN. Porém, mesmo com este menor teor o mosto apresentou valores suficientes para a fermentação e qualidade da bebida como descrito na literatura (KUNZE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006)

Tabela 13 - Parâmetros físicos e análises físico-químicas das cervejas elaboradas em escala laboratorial.

<b>Parâmetros</b>	<b>Cerveja Puro Malte</b>	<b>Cerveja FCP 30%</b>	<b>Cerveja FCP 45%</b>
<b>Etanol (% v/v)</b>	4,0±0,2	4,1±0,1	3,8±0,3
<b>Y<sub>p/s</sub> (g/g)</b>	0,41±0,01	0,41±0,01	0,41±0,01
<b>Eficiência (%)</b>	76,1	76,1	76,1
<b>Q<sub>p</sub> (g/L.h)</b>	0,21±0,01	0,22±0,01	0,21±0,02
<b>GRF (%)</b>	63,1±1,0	64,2±0,9	62,7±1,5
<b>Cor (EBC)</b>	11	26	27
<b>pH</b>	4,1	4,1	4,2
<b>Teor FAN inicial (mg/L)</b>	280±7	230±5	213±8
<b>Consumo FAN (%)</b>	59,6%±1,6%	55,2%±2,0%	54,4%±2,5%

Fonte: Próprio autor.

#### 5.4 Análises sensorial da cerveja produzida em escala de bancada

A análise sensorial das cervejas produzidas em escala de bancada consistiu na aplicação de um teste pareado de aceitação nas duas formulações de cervejas produzidas contendo castanha portuguesa. Estas formulações apresentavam FCP correspondente a 30% e 40% do extrato primitivo, identificadas como de amostras 1 e 2, respectivamente. E, a análise contou com a participação de 60 voluntários.

Tabela 14 - Média das notas da análise sensorial das cervejas com castanha portuguesa elaboradas em escala laboratorial.

	<b>Amostras</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Global</b>	7,6 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>
<b>Cor</b>	7,9 <sup>a</sup>	7,8 <sup>a</sup>
<b>Aroma</b>	7,3 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>
<b>Sabor</b>	7,3 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>
<b>Aparência</b>	7,9 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>
<b>Compra</b>	4,0 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>

Fonte: Próprio autor

Não se observa diferença estatisticamente significativa entre as médias dos parâmetros avaliados para as duas amostras avaliadas (Tabela 14). Os métodos afetivos, como o teste de aceitação empregado, consistem na manifestação subjetiva dos provadores, envolvendo não somente as sensações visuais, olfativas e gustativas propiciadas pela bebida, mas também a sua memória afetiva. Em uma interpretação geral pode-se demonstrar se tal produto agrada ou desagrade a um conjunto de participantes. Quanto maior e mais variado for o conjunto de participantes maior será a robustez do resultado. Porém, por se tratar de uma resposta com caráter subjetivo, esses testes apresentam elevada variabilidade nos resultados (TEIXEIRA, 2009).

Todavia, todos os parâmetros apresentaram notas elevadas, representados em uma visão geral pelo item “avaliação global” que obteve média 7,6 para as duas amostras, em que 7 equivale a “gostei moderadamente” e 8 à “gostei muito” na escala hedônica de 9 pontos. Merece destaque também os parâmetros de Cor e Aparência com médias próximas a 8,0, uma vez que este parâmetro foi o que mais se alterou em comparação a cerveja puro malte.

Sobre o parâmetro de intenção de compra, as duas amostras avaliadas apresentaram o resultado de resposta de “eu provavelmente compraria este produto”. Como não houve diferença estatística entre as duas amostras avaliadas optou-se por realizar a ampliação para a escala piloto da formulação contendo o maior teor de castanha portuguesa (45% do extrato primitivo), amostra 2. Conforme a literatura (WRIGHT et al., 2008; TEIXEIRA, 2009; DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010), a cerveja é um produto alimentício e, como qualquer outro produto

destinado a alimentação humana, a satisfação do consumidor provém de sua percepção positiva acerca da qualidade do alimento. Apenas a caracterização físico-química não é suficiente para inferir sobre a qualidade e aceitação de uma cerveja, pois mesmo com bons parâmetros ainda se pode ter uma bebida intragável. Desta forma, deve-se ter em mente que o próprio consumidor é quem deve orientar a elaboração do produto e avaliar a sua aceitação.

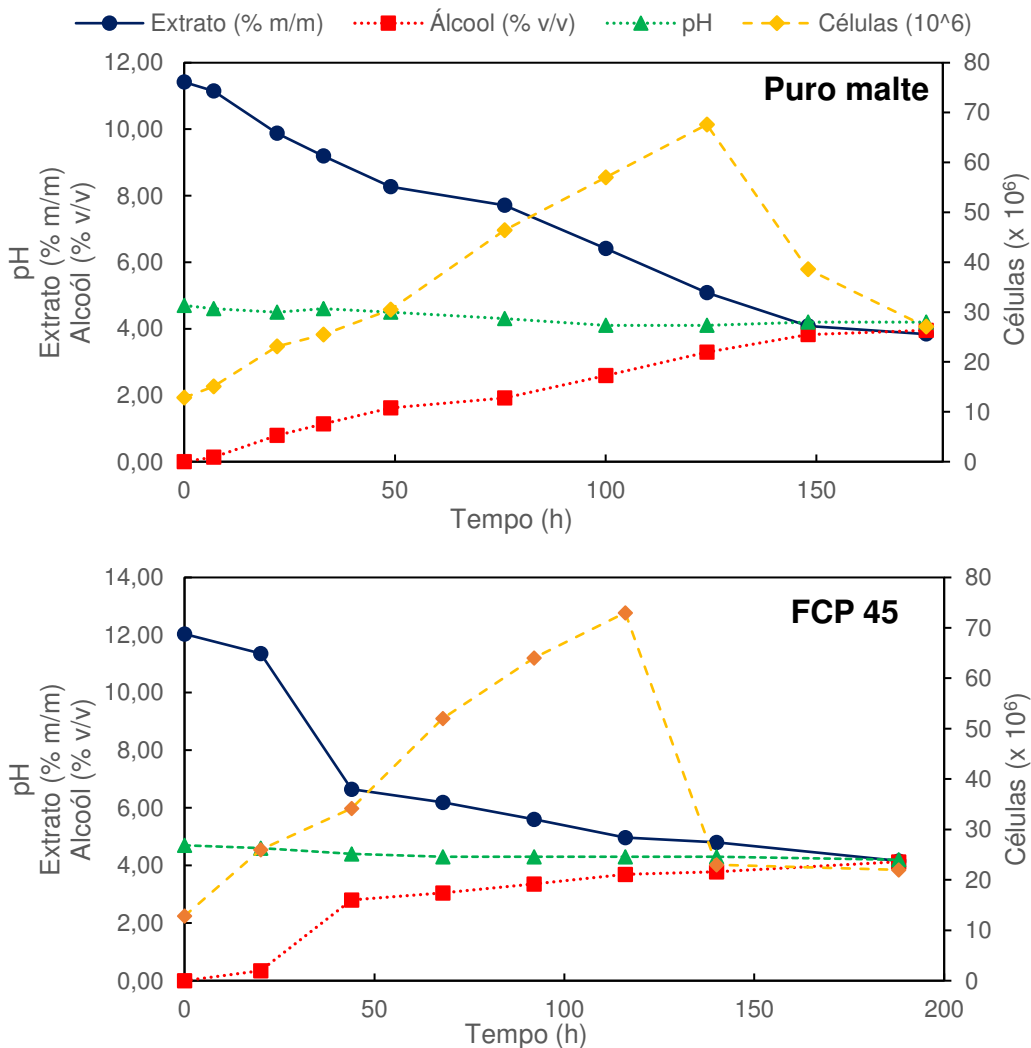
### 5.5 Produção da cerveja em escala piloto

Foi realizada a produção da cerveja com 45% de castanha portuguesa em escala piloto (100 L) utilizando a estrutura presente na Planta Piloto de Bebidas da Escola de Engenharia de Lorena. Para tal foi necessário levar em consideração as características da planta piloto, representada esquematicamente no Anexo 6. Um dos pontos cruciais era o ponto poço do sensor de temperatura, modelo termopar, que exigia um volume mínimo na tina de mosturação de 30 L. Desta forma não foi possível realizar o pré-tratamento da FCP nas condições otimizadas para a proporção de água (1:1 m/m), sendo necessária a utilização da proporção 1:1,5.

Do mesmo modo, produziu-se um mosto cervejeiro puro malte de cevada, usado como controle, sob as mesmas condições de mosturação. Outro ponto a ser levado em consideração ocorreu devido a temperatura do ambiente (inverno) durante a primeira fermentação. Mesmo com a fermentação se sucedendo, que é um processo exotérmico e que naturalmente elevaria a temperatura do meio (BOULTON; QUAIN, 2006), a temperatura do reator se manteve a 16°C. Desta forma para se manter condições equivalentes durante os experimentos optou-se por conduzir os dois processos em escala piloto a 16°C.

De forma análoga as fermentações em escala laboratorial, foram acompanhados os parâmetros de concentração de extrato (% m/m), teor de álcool (% v/v), pH e número de células em suspensão com a finalidade de ser realizado um estudo fermentativo. A evolução dos parâmetros em função do tempo (horas) está representada graficamente na Figura 9 respectivamente para a cerveja puro malte (branco) e para a cerveja com 45% do extrato primitivo derivado da castanha (FCP 45).

Figura 9 - Concentração do extrato real do mosto, da concentração celular, da concentração de etanol e do pH em escala piloto para os mostos puro malte e FCP45.



Fonte: Próprio autor.

Assim como na escala laboratorial a viabilidade celular manteve-se elevada, decaindo somente ao final atingindo valores ao redor de 95%. O crescimento celular foi novamente mais rápido durante a fase inicial apresentando o máximo de número de células em suspensão em torno de 120 horas de fermentação. O valor máximo para o número máximo de células em suspensão para as duas fermentações ficou próximo de  $7 \times 10^7$  de células/ml, valor superior ao observado em escala laboratorial. Estes dois fatos provavelmente ocorreram devido a temperatura do processo que pode ter retardado o metabolismo da levedura em comparação com o processo em escala laboratorial que ocorreu a  $18^\circ\text{C}$  e pela diferença do método de amostragem. Em escala laboratorial a amostragem não exigia a abertura do

reator o que impedia a entrada de ar atmosférico no fermentador. Por outro lado, no fermentador em escala piloto a amostragem era realizada pela tampa superior que permitia a entrada de ar atmosférico para o seu interior.

Também é possível observar ligeira produção de etanol (álcool % v/v) durante a fase de maior crescimento celular, mesmo com presença de oxigênio, devido ao efeito Crabtree (BOULTON; QUAIN, 2006). A queda no valor de número de células após 120 horas de fermentação é explicada pelos mesmos motivos da escala laboratorial com a sedimentação das leveduras à medida que o meio de fermentação se torna menos favorável. A Tabela 15 apresenta os parâmetros cinéticos e das análises físico-químicas entre as duas bebidas fermentadas em escala piloto.

Tabela 15 - Parâmetros físicos e análises físico-químicas das cervejas elaboradas em escala piloto.

<b>Parâmetros</b>	<b>Puro malte</b>	<b>FCP 45%</b>
<b>Etanol (% v/v)</b>	4,00±0,05	4,13±0,08
<b>Y<sub>p/s</sub> (g/g)</b>	0,41±0,01	0,41±0,01
<b>Eficiência (%)</b>	76,1	76,1
<b>Q<sub>p</sub> (g/L.h)</b>	0,18	0,17
<b>GRF (%)</b>	66,7	65,4
<b>Cor (EBC)</b>	9	25
<b>pH</b>	4,2	4,2
<b>Teor FAN inicial (mg/L)</b>	273±5	257±6
<b>Consumo FAN (%)</b>	65,2%	56,4%

Fonte: Próprio autor.

Assim como na escala laboratorial, não foi possível observar diferença estatística entre as médias dos parâmetros teor alcoólico, fator de conversão de substrato em produto, produtividade volumétrica e grau real de fermentação (GRF) entre a cerveja puro malte e a contendo castanha portuguesa. A cor final da cerveja puro malte cevada de 9 EBC foi classificada como amarelo dourado e da cerveja com castanha portuguesa de 25 EBC como acobreado claro, segundo a escala de coloração de cervejas pelo guia BJCP (STRONG; ENGLAND, 2015), classificando a cerveja com castanha portuguesa como uma cerveja escura (BRASIL, 2009). Como reportado por Zhu (2017), o processo de secagem da castanha para produção da farinha aumenta o teor de compostos derivados das reações de Maillard, o que provavelmente promoveu esta cor na cerveja.

O mosto elaborado com FCP também apresentou, como esperado, menor teor inicial de amino nitrogênio livre (FAN). Porém, o mosto FCP 45 produzido em escala piloto apresentou um teor de FAN inicial maior que o produzido em escala de laboratório, isso se deve provavelmente a um maior controle do processo permitido pela estrutura da planta piloto em comparação com a panela e fogo direto utilizado na escala laboratorial e pela diferença na proporção de água no pré-tratamento devido a escala. Novas investigações científicas são necessárias para avaliar o influência do processo de pré-tratamento sobre o teor de FAN. A produtividade volumétrica foi menor em escala piloto, mas deve-se lembrar que devido as condições ambientais a temperatura do processo foi inferior a utilizada em escala laboratorial o que influencia a atividade da levedura (BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, 2004; BOULTON; QUAIN, 2006).

#### 5.6 Análise sensorial da cerveja piloto em escala piloto

A análise sensorial das cervejas produzidas em escala piloto consistiu em um teste de aceitação entre a cerveja puro malte de cevada, a contendo castanha portuguesa (45%) e uma pilsen puro malte comercial, denominadas respectivamente de amostras 1, 2 e 3.

Nesta análise com a presença de uma cerveja comercial observa-se diferença estatisticamente significativa entre as médias de alguns dos parâmetros avaliados. Com relação a impressão global das amostras não foi possível observar diferenças entre as amostras avaliadas. A resposta média conforme a Tabela 16 ficou próximo de 7 inclusive para a cerveja puro malte comercial, representado na escala hedônica como “gostei moderadamente”. Assim como na análise sensorial das cervejas escala laboratorial, a cerveja contendo castanha portuguesa se destacou pela sua cor e aparência. Não foi observada diferença com relação ao aroma. Por outro lado, houve uma maior aceitabilidade com relação ao quesito sabor para a cerveja comercial (amostra 3). Isso provavelmente ocorreu por se tratar de uma cerveja comercial tipo *lager*, uma das líderes deste segmento no mercado brasileiro e pelo fato de os participantes provavelmente estarem mais habituados ao seu consumo, lembrando que a análise sensorial de aceitação com participantes não treinados compreende, invariavelmente, a memória afetiva. As cervejas elaboradas nesse trabalho são do tipo *ale*.



Tabela 16 - Média das notas da análise sensorial das cervejas com castanha portuguesa elaboradas em escala piloto.

	<b>Amostras</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Global</b>	6,7 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>
<b>Cor</b>	6,5 <sup>a</sup>	7,9 <sup>b</sup>	7,0 <sup>a</sup>
<b>Aroma</b>	7,5 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>
<b>Sabor</b>	6,4 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	7,2 <sup>b</sup>
<b>Aparência</b>	6,6 <sup>a</sup>	7,7 <sup>b</sup>	6,9 <sup>a</sup>
<b>Compra</b>	3,6 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a,b</sup>	4,0 <sup>b</sup>

Fonte: Próprio autor.

A intenção de compra traz informações interessantes. A intenção de compra da cerveja puro malte comercial obteve como resposta média “eu provavelmente compraria este produto”, não se diferenciando estatisticamente das respostas para a cerveja contendo castanha portuguesa. Por outro lado, a cerveja puro malte do tipo *ale* produzida neste trabalho não obteve o mesmo desempenho na avaliação sendo classificada como “eu tenho dúvidas se compraria este produto”. A mesma reflexão considerando a memória afetiva realizada sobre o parâmetro sabor pode ser aplicada sobre este resultado. Porém, merece destaque o resultado da cerveja contendo castanha portuguesa, em que sua aceitabilidade comparável a uma cerveja comercial demonstra o potencial sensorial desta bebida.

## 6 CONCLUSÃO

A castanha portuguesa é um adjunto amiláceo que possui uma temperatura de gelificação do seu amido relativamente elevada. Mas com a etapa de pré-tratamento térmico otimizada utilizando a metodologia de superfície de resposta foi possível tornar viável seu uso no processo cervejeiro.

As fermentações, tanto em escala laboratorial quanto piloto, com e sem adição de castanha portuguesa apresentaram a mesma tendência e parâmetros cinéticos e físico-químicos semelhantes. As principais diferenças foram os menores valores de FAN e a coloração mais intensa (acobreado claro) para as cervejas com castanha portuguesa.

A análise sensorial demonstrou boa aceitabilidade das cervejas contendo castanha portuguesa, inclusive quando comparada com a cerveja comercial. A alteração de cor proporcionada pelo adjunto obteve uma elevada aceitabilidade pelos participantes.

Este estudo demonstrou ser possível preparar cervejas utilizando a castanha portuguesa em até 45% do extrato primitivo, e outras proporções inferiores poderiam ser utilizadas agradando diferentes tipos de consumidores.

## 7 Recomendações para trabalhos futuros

Com o processo de pré-tratamento da castanha portuguesa desenvolvido, formulações de bebidas contendo porcentagens superiores a 45% podem ter sua aplicação e aceitabilidade avaliados. Também seria interessante avaliar o pré-tratamento utilizando enzimas exógenas ao invés de malte e, em seguida, a sacarificação enzimática para desenvolver um mosto 100% castanha portuguesa. Este, então, poderia ser utilizado para produzir uma bebida fermentada, carbonatada e sem glúten que poderia ser consumida pela população celíaca.

Sobre um ponto de vista da aceitabilidade do produto, a sua fermentação com leveduras *lager* e elaboração do produto com lúpulos nobres podem aproximar a cerveja ao sabor mais comumente encontrado nas cervejas comerciais, sem perder as qualidades provenientes da castanha, e impactar positivamente a sua aceitação.

Ainda, pode-se estudar a produção de bebidas de baixo teor alcóolico ou sem álcool, inclusive probióticas, visando produtos que podem trazer benefícios a saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS

ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus – a story that begs to be told . A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.

AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. **About ASBC**. Disponível em: <https://www.asbcnet.org/membership/about/Pages/default.aspx>.

ANDRADE, C. M. **Obtenção de chope utilizando arroz preto (Oryza sativa) como adjunto de malte**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 121–128, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v23n2/v23n2a04.pdf>.

BAMFORTH, C. W. Brewing and brewing research: past, present and future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 9, p. 1371–1378, 2000. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0010\(200007\)80:9%3C1371::AID-JSFA654%3E3.0.CO;2-K/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0010(200007)80:9%3C1371::AID-JSFA654%3E3.0.CO;2-K/full).

BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 353–357, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.03.001>.

BAMFORTH, C. W. 125th anniversary review: The non-biological instability of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 488–497, 2011.

BAMFORTH, C. W. Progress in Brewing Science and Beer Production. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 8, n. 1, p. 161–176, 2017. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450>.

BATISTA, R. A. **Produção e avaliação sensorial de cerveja com pinhão (*Araucaria angustifolia*)**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

BATISTA, R. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Scenery of craft and large beer in Brazil and Europe: Historic, market and trends. **European International Journal of Science and Technology**, v. 6, n. 7, p. 36–47, 2017. Disponível em: [www.eijst.org.uk](http://www.eijst.org.uk).

BERCHE, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 1–6, 2012.

BLACK, K.; BARNETT, A.; TZIBOULA-CLARKE, A.; WHITE, P. J.; IANNETTA, P. P. M.; WALKER, G. Faba bean as a novel brewing adjunct : Consumer evaluation. **J. Inst. Brew.**, v. 125, p. 310–314, 2019.

BOGDAN, P.; KORDIALIK-BOGACKA, E. Alternatives to malt in brewing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 1–9, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.001>.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157–172, 2013. Disponível em: <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00060-12>.

BORGES, O.; GONÇALVES, B.; DE CARVALHO, J. L. S.; CORREIA, P.; SILVA, A. P. Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 976–984, 2008.

BOSCO, J. H. Produtores Brasileiros Apostam no Cultivo da Castanha Asiática. **Canal Rural**, 2012. Disponível em: <https://canalrural.uol.com.br/noticias/agricultura/produtores-brasileiros-apostam-cultivo-castanha-asiatica-34614/>.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. [s.l.]: Blackwell Science, 2006.

BOUNOUS, G. The chestnut: a multipurpose resource for the new millennium. **Acta Horticulturae**, v. 693, p. 33–40, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Resolução-rdc nº 263, de 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Decreto no 6.871, de 4 de junho de 2009, regulamenta a lei que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, 2009. Acesso em: 23 de novembro de 2019. 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).

BRIGGS, E. D.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing science and practice**. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004.

BUENO, S. C. S.; PIO, R. Castanha tipo portuguesa no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 16–22, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452014000100004&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000100004&lng=pt&tlng=pt).

BUENO, S. C. S.; PIO, R.; RESENDE, S. R. dos S.; WIECHMANN, C. J. S.; GOMES, D.; MOREIREA, A. C. V.; STEEL, C. J. **Castanha tipo portuguesa**. Campinas (SP): Boletim Técnico. CATI., 2018. Disponível em: <http://www.cdrs.sp.gov.br/portal/themes/unify/arquivos/produtos-e-servicos/acervo-tecnico/BoletimTecnicoCastanhaPortuguesa246CATI.pdf>.

CARVALHO, G. B. M. de. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante**. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

CARVALHO, G. B. M. de; SILVA, C. V. B.; ALMEIDA E SILVA, J. B. de. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1 parte – as leveduras. **Revista Analytica**, v. 25, p. 36–42, 2006.

CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. (Ed.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. p. 45–78.

CHO, J.-H.; KIM, I.-D.; DHUNGANA, S. K.; DO, H.-M.; SHIN, D.-H. Persimmon fruit enhanced quality characteristics and antioxidant potential of beer. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 1067–1073, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0340-2>.

CUTAIA, A. J.; REID, A. J.; ALEX SPEERS, R. Examination of the relationships between original, real and apparent extracts, and alcohol in pilot plant and commercially produced beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 4, p. 318–327, 2009.

D'AVILA, R.; LUVIELMO, M.; MENDONÇA, C. R.; JANTZEN, M. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 60–68, 2012. Disponível em: [http://revistas.unisinos.br/index.php/estudos\\_tecnologicos/article/view/4160](http://revistas.unisinos.br/index.php/estudos_tecnologicos/article/view/4160).

DAMEROW, P. Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient Mesopotamia. **Cuneiform Digital Library Journal**, v. 2, n. January, p. 1–20, 2012. Disponível em: [http://www.cdli.ucla.edu/pubs/cdlj/2012/cdlj2012\\_002.html](http://www.cdli.ucla.edu/pubs/cdlj/2012/cdlj2012_002.html).

DANTAS, E. **Relatório Anual de Sustentabilidade da Cervejaria AMBEV - 2017**. [s.l.]. Disponível em: [https://www.ambev.com.br/conteudo/uploads/2018/08/Relatorio\\_Anuar\\_de\\_Sustentabilidade\\_Ambev\\_2017.pdf](https://www.ambev.com.br/conteudo/uploads/2018/08/Relatorio_Anuar_de_Sustentabilidade_Ambev_2017.pdf).

DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v.

23, n. 1, p. 108–112, 2000.

DE VASCONCELOS, M. C. B. M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S.; FERREIRA-CARDOSO, J. V. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: Fresh and processed products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1578–1589, 2010.

DEAK, T. **Handbook of food spoilage yeasts**. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC press Taylor & Francis, 2007.

DELYSER, D. Y.; KASPER, W. J. Hopped Beer: The Case For Cultivation. **Economic Botany**, v. 48, n. 2, p. 166–170, 1994.

DEMIATE, I. M.; OETTERER, M.; WOSIACKI, G. Characterization of chestnut (*castanea sativa*, mill) starch for industrial utilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 69–78, 2001.

DJAMEH, C.; SAALIA, F. K.; SINAYOBYE, E.; BUDU, A.; ESSILFIE, G.; MENSAH-BROWN, H.; SEFA-DEDEH, S. Optimization of the sorghum malting process for pito production in Ghana. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 1, p. 106–112, 2015.

DONADINI, G.; PORRETTA, S. Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. **Food Research International**, v. 91, p. 183–198, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.043>.

DOWHANICK, T. M. Levedura - cepas y técnicas de manejo. In: **El cervecero en la práctica**. 3<sup>a</sup> ed. Minnesota: Master Brewers Association of Americas, 2002.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. de. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. p. 15–50.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Quim. Nova**, v.



42, n. 8, p. 900–919, 2019.

EUMANN, M.; SCHILDBACH, S. 125 th Anniversary Review : Water sources and treatment in brewing. **J. Inst. Brew.**, v. 118, n. 1, p. 259–267, 2012

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **ANALYTICA - EBC**. Nürnberg: EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **About the European Brewery Convention**. Disponível em: <https://europeanbreweryconvention.eu>.

FAOSTAT. **Statistics Division of Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

FERMENTIS DIVISION OF S.I. LESAFFRE. **Folha de dados técnicos - SafAle™ US-05 - Rev: Julho2017**. Disponível em: <https://fermentis.com/wp-content/uploads/2017/10/SafAle-US-05-PT.pdf>.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; JORGE, K.; NOGUEIRA, L. C.; SILVA, F.; TRUGO, L. C. Effects of the Combination of Hydrophobic Polypeptides , Iso- alpha Acids , and Malto-oligosaccharides on Beer Foam Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4976–4981, 2005.

FERREIRA, M.; GUIDO, F. Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 23, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2311-5637/4/2/23>.

GLATTHAR, J.; HEINISCH, J. J.; SENN, T.; GLATTHAR, J.; HEINISCH, J. J.; SENN, T.; TECHNOLOGY, F.; FERMENTATION, S. The Use of Unmalted Triticale in Brewing and its Effect on Wort and Beer Quality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, n. 4, p. 182–190, 2018a.

GLATTHAR, J.; HEINISCH, J.; SENN, T. Unmalted triticale cultivars as brewing adjuncts : effects of enzyme activities and composition on beer wort quality. **Journal**

of the **Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 647–654, 2005.

GLATTHAR, J.; HEINISCH, J.; SENN, T.; GLATTHAR, J.; HEINISCH, J.; SENN, T.; TECHNOLOGY, F. A Study on the Suitability of Unmalted Triticale as a Brewing Adjunct. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 60, n. 4, p. 181–187, 2018b.

GODLASKI, T. M. Osiris of bread and beer. **Substance Use and Misuse**, v. 46, n. 12, p. 1451–1456, 2011.

GOMES, D.; VALENTINI, S. R. de T.; CASTRO, M. F. P. P. M. de. Castanha Portuguesa no Estado de São Paulo. **Apta regional: Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, n. 2, p. 1–5, 2013.

GRUJIC, O. Application of Unconventional Raw Materials and Procedures in Wort Production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 105, n. 5, p. 275–278, 1999.

HATCH, M. J.; SCHULTZ, M. Toward a Theory of Using History Authentically: Historicizing in the Carlsberg Group. **Administrative Science Quarterly**, v. 62, n. 4, p. 657–697, 2017.

HENDGES, D. H. **Produção de cervejas com teor reduzido de etanol, contendo quinoa malteada como adjunto**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

ISOZAKI, Y. **Kirin Beer University Report Global Beer Consumption by Country in 2016**. [s.l.]. Disponível em: [https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2017/1221\\_01.html](https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2017/1221_01.html).

JAMAR, C.; JARDIN, P.; FAUCONNIER, M. L. Cell wall polysaccharides hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.): a review. **Biotechnol Agron Soc Environ**, v. 15, n. 2, p. 301–313, 2011. Disponível em: <http://www.doaj.org/doaj?func=fulltext&ald=769130>.

JORGE, T.; LINDNER, J. D. D.; MEJIA, S. M. V.; MATTIONI, B.; ROTTA, J.; MORÉS, S.; FRANCISCO, A. De; SANT'ANNA, E. S. Physicochemical study of pinhão flour as source of adjunct in beer production. **J. Inst. Brew.**, v. 124, p. 365–373, 2018.

KEERSMAECKER, J. De. The Mystery of Lambic Beer. **Scientific American**, v. 275, n. Agosto, p. 74–80, 1996.

KOREL, F.; BALABAN, M. Ö. Chemical composition and health aspects of chestnut (*Castanea spp.*). In: **Tree nuts**. [s.l.]: CRC Press, 2008. p. 171.

KOSTELECKY, T. 125th Anniversary Review : The Role of Hops in Brewing. **J. Inst. Brew.**, v. 117, n. 3, p. 259–267, 2011.

KROTTENTHALER, M.; BACK, W.; ZARNKOW, M. Wort Production. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2009. p. 165–205.

KUNZE, W. **TECHNOLOGY: Brewing & Malting**. 4ª edição. Berlin: VBL, 2004.

LEE, J. W.; CHOI, H. W.; SEO, D. H.; PARK, J. D.; KUM, J. S.; KIM, B. Y.; BAIK, M. Y. Isolation and characterization of starches from chestnuts cultivated in three regions of Korea. **Starch/Staerke**, v. 67, n. 7–8, p. 585–594, 2015.

LEMOS, A. M.; ABRAÃO, A. S.; MORGADO, M. L.; REBELO, M.; NUNES, F. M. Effect of granular characteristics on the viscoelastic and mechanical properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill). **Food Hydrocolloids**, v. 51, n. 1, p. 305–317, 2015.

LODOLO, E. J.; KOCK, J. L. F.; AXCELL, B. C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.

MANZOLLI, E. S. **Produção de cerveja utilizando laranja como adjunto de**

**malte**. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

MATHIAS, T. R. dos S.; MELLO, P. P. M. de; SÉRVULO, E. F. C. Nitrogen compounds in brewing wort and beer : A review. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 5, n. 2, p. 10–17, 2014.

MATHIAS, T. R. dos S.; MELLO, P. P. M. de M.; SERVULO, E. F. C. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <http://academicjournals.org/journal/JBD/article-abstract/0E6313746212>.

MEDEIROS, M.B. ; AIZEMBERG, R. ; SILVA, T.A.O ; ALMEIDA e SILVA, J.B. . Produção de Cerveja. In: BERNARDO DIAS RIBEIRO, KAREN SIGNORI PEREIRA, RODRIGO PIRES DO NASCIMENTO, MARIA ALICE ZARUR COELHO. (Org.). **Microbiologia Industrial Alimentos**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2018, v.2, p. 73-177.

MEUSSDOERFFER, F. G. A Comprehensive History of Beer Brewing. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. [s.l.]: Wiley-Blackwell, 2009. p. 1–42.

MIEDL, M.; GARCIA, M. A.; BAMFORTH, C. W. Haze formation in model beer systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10161–10165, 2005.

MINITAB, I. **Minitab 18.1** Estados unidos da america Minitab Inc., 2017.

MINTEL GROUP. **Consumidor brasileiro de cerveja prefere qualidade à quantidade**. Disponível em: <https://brasil.mintel.com/imprensa/alimentos-e-bebidas/consumidor-brasileiro-de-cerveja-prefere-qualidade-a-quantidade>. Acesso em: 30 nov. 2019.

MONTGOMERY, D. C. **Diseño y Análisis de Experimentos**. 2. ed. Ciudad de

México: Limusa Wiley, 2004.

MOURA-NUNES, N.; BRITO, T. C.; FONSECA, N. D. Da; DE AGUIAR, P. F.; MONTEIRO, M.; PERRONE, D.; TORRES, A. G. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 199, p. 105–113, 2016.

MOURA, F. P. de; MATHIAS, T. R. dos S. A Comparative Study of Dry and Wet Milling of Barley Malt and Its Influence on Granulometry and Wort Composition. **Beverages**, v. 4, n. 3, p. 51, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2306-5710/4/3/51>.

MÜLLER, C. V.; MARCUSSO, E. F. Anuário Da Cerveja No Brasil. 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-no-brasil-2018>.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology**: process and product optimization using designed experiments. New York: John Wiley & Sons, 1995.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**: aplicações na Ciência e na Indústria. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Bookman, 2010.

NUNES, C. da S. O.; CARVALHO, G. B. M. de; SILVA, Ma. L. C. da; SILVA, G. P. da; MACHADO, B. A. S.; UETANABARO, A. P. T. Cocoa pulp in beer production : Applicability and fermentative process performance. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2017.

O'CONNOR-COX, E. S. C.; INGLEDEW, W. M. Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 89–95, 1991.

OLAJIRE, A. A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, p. 1–21, 2012. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>.

PANDA, S. K.; PANDA, S. H.; SWAIN, M. R.; RAY, R. C.; KAYITESI, E. Anthocyanin-rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) beer : technology , biochemical and sensory evaluation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 3040–3049, 2015.

POELMANS, E.; SWINNEN, J. F. M. A Brief Economic History of Beer. In: **The Economics of Beer**. [s.l.]: Oxford University Press, 2011. p. 3–28.

SANTOS, C. D. de O. **Avaliação do emprego do arroz preto (*Oryza sativa* L.) submetido a hidrólise enzimática como adjunto na fabricação de cerveja**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, B. **Biotecnologia Industrial - Vol. 2**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SILVA, D. P. da. **Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares**. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

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

SOUZA, A. G. De; SILVA, A. R. Z.; RENATA, C.; SILVA, D. M. Propriedades nutricionais da castanhas portuguesa (*Castanea sativa* Mill) e elaboração de produtos. **Cadernos da Escola de Saúde, Curitiba**, v. 12, p. 109–124, 2014.

SOUZA, P. G. **Obtenção de cervejas tipo lager com uso de farinha de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) como adjunto e bioprocesso conduzido com Leveduras livres e imobilizadas**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas,

Manaus, 2010.

STRONG, G.; ENGLAND, K. **Beer styles guidelines**. [s.l.] BJCP, Inc, 2015. v. 1  
STUBITS, M.; TENG, J.; PEREIRA, J. Characterization of Malt Grist Fractions. **ASBC Journal**, v. 44, n. 1, p. 12–15, 1986.

TAYLOR, B.; ORGAN, G. Sensory Evaluation. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of brewing: Processes, Technology, Markets**. [s.l.] Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2009. p. 675.

TEIXEIRA, L. V. Análise Sensorial Na Indústria De Alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, p. 12–21, 2009.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e cervejarias: a história, a arte e a tecnologia**. São Paulo: Aden, 2001.

VALAMOTI, S. M. Brewing beer in wine country? First archaeobotanical indications for beer making in Early and Middle Bronze Age Greece. **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 27, n. 4, p. 611–625, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00334-017-0661-8>.

VASCONCELOS, Y. Inovações cervejeiras. **Pesquisa Fapesp**, v. 251, 2017. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2017/01/09/inovacoes-cervejeiras/?cat=capa>.

WANG, J.; LIU, L.; BALL, T.; YU, L.; LI, Y.; XING, F. Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 23, p. 6444–6448, 2016. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1601465113>.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Global status report on alcohol and health 2014. **Global status report on alcohol**, p. 1–392, 2014. Disponível em: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msbgsrup-rofiles.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsrup-rofiles.pdf).

WRIGHT, C. A.; BRUHN, C. M.; HEYMANN, H.; BAMFORTH, C. W. Beer consumers' perceptions of the health aspects of alcoholic beverages. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. 12–17, 2008.

YANG, B.; JIANG, G.; NAGENDRA PRASAD, K.; GU, C.; JIANG, Y. Crystalline, thermal and textural characteristics of starches isolated from chestnut (*Castanea mollissima* Bl.) seeds at different degrees of hardness. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 995–999, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.002>.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Insitituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHANG, T.; ZHANG, H.; YANG, Z.; WANG, Y.; LI, H. Black rice addition prompted the beer quality by the extrusion as pretreatment. **Food Sci Nutr.**, v. 7, p. 3664–3674, 2019.

ZHANG, W.; CHEN, H.; WANG, J.; WANG, Y.; XING, L.; ZHANG, H. Physicochemical properties of three starches derived from potato, chestnut, and yam as affected by freeze-thaw treatment. **Starch/Staerke**, v. 66, n. 3–4, p. 353–360, 2014.

ZHU, F. Properties and Food Uses of Chestnut Flour and Starch. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 7, p. 1173–1191, 2017.



## ANEXOS

### Anexo 1.

Tabela 17. Características físico-químicas da água do poço artesiano da EEL-USP.

Características	Resultado	Possível afetação
pH	6,66	Corrosão ou inibição das enzimas
Odor	Poucos odores	Defeito sensorial (odor)
Sabor	Livre	Defeito sensorial (teste)
Aspecto	Limpo	Defeito sensorial (visual)
Turbidez	0,54 UNT	Defeito sensorial (visual)
Cor	< 5 mg PI/L	Defeito sensorial (visual)
Dureza total	26 mg/L	Depende do tipo de cerveja a elaborar
Cloretos	1,2 mg/L	Corrosão e sabor salgado
Nitratos	0,19 mg/L	Câmbios na fermentação (elaboração sensorial)
Ferro	0,055 mg/L	Deteção sensorial (teste e turbidez)

Fonte: Aizemberg, (2012).

## Anexo 2.

Características do malte Pilsen da Malteria Soufflet (Taubaté - SP) utilizado no projeto.

Características	Resultados
Aspecto, Cor e Odor do malte	Normais
Umidade (%)	4,5
Extrato M.F. i.a. (%) <sup>a</sup>	81,0
Diferença de Extrato (%) <sup>b</sup>	1,5
Cor do mosto após fervura (EBC)	5,8
Sacarificação (min)	< 10
Proteína Total s.s. (%)	10,0
Nitrogênio Solúvel malte s.s. (mg/100g)	708
Nitrogênio Amíno Livre FAN (mg /100g)	140
Índice de Kolbach	45
Poder diastásico (WK)	272
pH do mosto	6,00

a - Rendimento do extrato moagem fina base seca.

b - Diferenças de rendimentos de moagem fina e grossa.

Fonte: Malteria Soufflet (2018).

## Anexo 3. Ficha de avaliação da análise sensorial.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Por favor, avalie a amostra codificada da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

Código da amostra: \_\_\_\_\_

- 9 – Gostei extremamente
- 8 – Gostei muito
- 7 – Gostei moderadamente
- 6 – Gostei ligeiramente
- 5 – Nem gostei / nem desgostei
- 4 – Desgostei ligeiramente
- 3 – Desgostei moderadamente
- 2 – Desgostei muito
- 1 – Desgostei extremamente

Notas:  
 Impressão global: \_\_\_\_\_  
 Cor: \_\_\_\_\_  
 Aroma: \_\_\_\_\_  
 Sabor: \_\_\_\_\_  
 Aparência: \_\_\_\_\_

Código da amostra: \_\_\_\_\_ ( )

Assinale qual seria sua atitude quanto à compra do produto.

- 5 – Eu certamente compraria este produto \_\_\_\_\_ ( )
- 4 – Eu provavelmente compraria este produto \_\_\_\_\_ ( )
- 3 – Eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto \_\_\_\_\_ ( )
- 2 – Eu provavelmente não compraria este produto \_\_\_\_\_ ( )
- 1 – Eu certamente não compraria este produto \_\_\_\_\_ ( )

Comentários:

\_\_\_\_\_

Anexo 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde já fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

Título do Projeto: **Desenvolvimento e avaliação sensorial de cerveja utilizando castanha portuguesa (*Castanea Sativa* Mill) como adjunto**

Pesquisador Responsável: Júlio de Góes Soares

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (11) 99604-6289

Pesquisadores participante: João Batista de Almeida Silva

Telefones para contato: (12) 3159 5044, (12) 8116 2490

O objetivo do trabalho é contribuir para o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de cervejas utilizando adjuntos não convencionais, neste caso, empregando farinha de Castanha Portuguesa (FCP). Será estudado a composição da FCP, determinada a temperatura de geleificação do amido presente na FCP, e em seguida as condições de mosturação da FCP como adjunto de malte serão otimizadas através de técnicas de planejamento experimental. Serão elaborados mostos com 30% e 45% do extrato inicial vindo da FCP, e o restante do extrato será proveniente do malte. Serão produzidas cervejas utilizando leveduras de alta fermentação (*ale*), cepa S-05 da Fermentis®. Assim, totalizando duas diferentes amostras de cerveja. A análise sensorial será feita em duas etapas, por meio de testes afetivos. Em um primeiro momento, será feito um teste para a escolha entre as 2 cervejas elaboradas; e em outro momento, a variante escolhida será comparada com uma cerveja comercial. As análises serão realizadas no laboratório de sensorial da Microcervejaria da EEL, em cabines individuais sob condições adequadas de iluminação e temperatura. Os testes serão realizados por consumidores comuns, convocados por intermédio de informativos distribuídos nos campi da Escola de Engenharia de Lorena e selecionados quando consumidores habituais do produto, superiores a 18 anos de idade. Existem risco mínimo, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa, com garantia de sigilo e direito de retirar o consentimento a qualquer momento. Este

estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de novos produtos.

**Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:**

1. Que o trabalho tem por finalidade desenvolver uma tecnologia de produção de cervejas utilizando como adjunto a farinha de Castanha Portuguesa;
2. Que como voluntário deste estudo, terei que participar do teste de aceitação das cervejas e informar o quanto gostei ou desgostei do produto;
3. Que a minha participação como voluntário se limitará a uma seção de avaliação sensorial de aproximadamente 15 minutos em um único dia;
4. Que terei risco mínimo ao participar dessa pesquisa; já que será apenas uma seção com consumo de um pequeno volume do produto, sendo a quantidade de etanol consumida eliminada do sangue em um tempo máximo de 30 minutos;
5. Que necessitarei comparecer ao laboratório de análise sensorial da Microcervejaria da EEL para a realização do teste de aceitação do produto;
6. Que não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
7. Que meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
8. Que poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
9. Eu não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa;
10. Concordo que este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para o desenvolvimento de novos produtos;
11. Que em caso de qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (Júlio de Góes Soares, cel: 11 99604-6289);
12. Que tenho conhecimento que este projeto foi avaliado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo **Desenvolvimento e avaliação sensorial de cerveja utilizando castanha portuguesa (*Castanea sativa* Mill) como adjunto.**

Nome e Assinatura do pesquisador



Júlio de Góes Soares

Mestrando em Biotecnologia Industrial  
Escola de Engenharia de Lorena – USP  
+55 11 99604-6289

**CONTATO | COMITÊS DE ÉTICA (CEP E CEUA) – EACH USP**

Responsável: Luís Fernando Simões Moraes

Telefone: (11) 3091-1046

Email CEP: cep-each@usp.br

Email CEUA: ceua-each@usp.br

Atendimento: Segunda à sexta-feira das 10h às 12h e das 14h às 16h

Localização: Prédio I1 | Sala T14

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **produção e avaliação sensorial de cerveja utilizando farinha de castanha portuguesa (*Castanea Sativa* Mill) como adjunto**, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Júlio de Góes Soares sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura do Voluntário \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador \_\_\_\_\_  
Júlio de Góes Soares

Assinatura do Orientador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

Anexo 5.

### **Cálculo para Preparo do Mosto Cervejeiro em escala de Bancada**

Para produção de mosto com concentração de 12 °P. para isto, baseado na literatura e em experimentos anteriores, algumas etapas foram seguidas baseado em trabalhos anteriores do grupo (SILVA, 2005).

#### **Etapa 1. Volume de mosto necessário na caldeira pós-fervura ( $V_{PF}$ )**

O volume necessário na caldeira pós-fervura foi obtido pela soma do volume desejado de mosto a ser transferido para o tanque de fermentação (100 L), do volume de perda eventual ocorrido durante as transferências (15 L) e do volume de mosto utilizado para a retirada de trub ou sedimento cervejeiro (5 L):

$$V_{PF} = 15 L + 0,5 L + 1,5 L = 17 L$$

#### **Etapa 2. Quantidade necessárias de malte de insumo e água primária e secundária**

##### **2.1. Mosto puro malte**

##### **2.1.1. Quantidade de Insumo**

Conhecido o volume necessário de mosto na caldeira pós-fervura ( $V_{PF} = 17 L$ ), este valor foi usado de modo conjunto com a densidade (1,050006 g/mL) de um mosto a 12 °P (equivalente a gramas de sacarose por 100 g de mosto), a eficiência de processo de mostura (75%) e o rendimento em extrato do malte como 79,5 % para obter a real massa necessária de malte a ser moído:

$$M_{Malte} = Volume (L) \times Extrato \left( \frac{kg}{kg} \right) \times Densidade \left( \frac{kg}{L} \right) \times 1/\eta_{insumo} \times 1/\eta_{processo}$$

Onde,  $\eta_{malte}$ : Rendimento em extrato do insumo (%);

$\eta_{processo}$ : Eficiência do processo (%).

$$M_{Malte} = 17 L \times 12 kg/100 kg \times 1,05006 kg/L \times (100/75) \times (100/79,5) = 3,593 kg$$

#### **Etapa 3. Volume de água necessário para a mosturação (água primária)**

Conforme descrito na literatura cervejeira, em geral utiliza-se um intervalo de concentração entre 200 e 350 g/L, dependendo do tipo e característica do produto desejado. Todos os experimentos do planejamento experimental foram conduzidos com uma concentração de 285 g/L. Desta forma, o volume de água primária necessário para elaboração do mosto puro malte é de 12,60 L ( $V_{H_2O} 1^\circ$ ).

#### **Etapa 4. Volume de água para lavagem do bagaço na filtração (água secundária)**

Para cálculo do volume de água necessário para a lavagem do bagaço durante a filtração (denominada água secundária,  $V_{H_2O} 2^\circ$ ), inicialmente foi necessário obter o volume de água primária retida pelo bagaço durante a filtração e o volume de mosto na caldeira antes da fervura. Assim, o volume de água secundária foi obtido pela soma destes volumes menos o volume de água primária utilizado na mosturação. Segundo literatura e experimentos realizados, 1 kg de malte moído retém o equivalente a 1 L de água. O volume na caldeira antes da fervura foi obtido acrescentando-se o valor da taxa de evaporação nos 10 L desejado pós-fervura (10 %), o qual depende do tempo de fervura utilizado (75 - 90 min):

$$V_{H_2O\ 2^\circ} = 3,563\text{ L} + V_{PF} + (V_{PF} \times 0,10) - V_{H_2O\ 1^\circ} = 3,6\text{ L} + 16,5\text{ L} - 12,60\text{ L} \approx 7,5\text{ L}$$

## 2.2. Mosto com 45% do extrato derivado da Castanha Portuguesa

### Etapa 2. Quantidade de Insumo

Utilizando o mesmo volume de mosto na caldeira pós-fervura ( $V_{PF} = 17\text{ L}$ ), a densidade ( $1,050006\text{ g/mL}$ ) de um mosto a  $12\text{ }^\circ\text{P}$ , o rendimento de processo de mosturação ( $75\%$ ), e o rendimento em extrato para a FCP como  $55,3\%$ :

$$M_{\text{Malte}} = RE (\%) \times \text{Volume (L)} \times \text{Extrato} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}}\right) \times \text{Densidade} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \frac{1}{\eta_{\text{insumo}}} \times \frac{1}{\eta_{\text{processo}}}$$

Onde, RE: Razão em extrato (%);

$\eta_{\text{malte}}$ : Rendimento em extrato do insumo (%); e,

$\eta_{\text{processo}}$ : Eficiência do processo (%).

$$M_{\text{Malte}} = 0,55 \times 17\text{ L} \times 12\text{ g/100 g} \times 1,05006\text{ g/mL} \times (100/75) \times (100/79,5) = 1,976\text{ kg}$$

$$M_{\text{FCP}} = 0,45 \times 17\text{ L} \times 12\text{ g/100 g} \times 1,05006\text{ g/mL} \times (100/75) \times (100/55,3) = 2,324\text{ kg}$$

Para o pré-cozimento da FCP será utilizado uma quantidade de malte equivalente a  $40\%$  em massa a quantidade total de FCP, ou seja,  $930\text{ g}$ . A proporção de água de  $1:1$  ( $3,3\text{ L}$ ).

### Etapa 3. Volume de água necessário para a mosturação (água primária)

De maneira análoga ao mosto puro malte, com uma concentração de  $285\text{ g/L}$ , o volume de água primária necessário para elaboração do mosto é de  $15,10\text{ L}$  ( $V_{H_2O\ 1^\circ}$ ). Como já foram adicionados  $3,3\text{ L}$  no pré-cozimento o volume de água adicionado para mosturação foi de  $11,8\text{ L}$ .

### Etapa 4. Volume de água para lavagem do bagaço na filtração (água secundária)

Considerando o volume na caldeira antes da fervura foi obtido acrescentando-se o valor da taxa de evaporação nos  $17\text{ L}$  desejado pós-fervura ( $10\%$ ), o qual depende do tempo de fervura utilizado ( $60\text{ min}$ ):

$$V_{H_2O\ 2^\circ} = 4,3\text{ L} + V_{PF} + (V_{PF} \times 0,10) - V_{H_2O\ 1^\circ} = 4,3\text{ L} + 17,5\text{ L} - 15,1\text{ L} \approx 7\text{ L}$$

### Etapa 5. Quantidade necessária de lúpulos (pellets)

Padronizou-se  $15\text{ IBU}$  (unidades internacionais de amargor) como o amargor a ser usado no mosto cervejeiro e, por consequência, a ser obtido no produto pós-maturado. Conforme (KUNZE, 2004), cervejas com  $15\text{ IBU}$  necessitam de  $15\text{ mg/L}$  de iso alfa-ácido no mosto; considerando o rendimento equivalente a  $25\%$ , a quantidade total de iso alfa-ácido requerida em  $17\text{ L}$  pós-fervura é:

$$[(15\text{ mg/L} \times 100\%) / 25\%] \times 17\text{ L} = 1,02\text{ g}$$

Considerando na primeira dosagem  $100\%$  dos iso alfa-ácido ( $1,02\text{ mg}$ ) provenientes de lúpulo pellets com o rendimento de  $13,9\%$  de alfa-ácido, os seguintes cálculos foram realizados para obtenção da quantidade necessária de lúpulos:

$$(1,02\text{ mg} \times 100\%) / 13,9\% = 7,34\text{ g (pellets)}$$



Anexo 6. Microcervejaria piloto da Escola de Engenharia de Lorena – USP (SILVA, 2005).

