



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE DE CEILÂNDIA- FCE
CURSO DE FARMÁCIA

THIAGO MURATORI BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL COM POLPA DE MARACUJÁ
AMARELO (*PASSIFLORA EDULIS F. FLAVICARPA DEG*) E AVALIAÇÃO DA
IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.**

BRASÍLIA, DF

2016

THIAGO MURATORI BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL COM POLPA DE MARACUJÁ
AMARELO (*PASSIFLORA EDULIS F. FLAVICARPA DEG*) E AVALIAÇÃO DA
IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF

2016

THIAGO MURATORI BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL COM POLPA DE MARACUJÁ
AMARELO (*PASSIFLORA EDULIS* F. *FLAVICARPA* DEG) E AVALIAÇÃO DA
IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(FCE/ Universidade de Brasília)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar ao meu lado durante toda a minha trajetória, tanto nos momentos bons, como nos momentos ruins.

A minha família por todo incentivo que me deram.

Especialmente as mulheres que me ajudaram a chegar onde estou, dentre elas, minha mãe, que sempre se esforçou o máximo pra me dar o melhor, assim como minha falecida avó Leonidia Muratori Barbosa, que na ausência de um pai me ensinou a ser o homem que eu sou.

A minha tia Aparecida Barbosa Rodrigues, juntamente com meu tio Arnaldo, que me ajudaram a realizar o sonho de fazer uma graduação.

De forma especial minha orientadora Dra. Daniela Castilho Orsi, que sempre me ajudou, esclarecendo minhas dúvidas, além de sempre estar presente quando eu precisei de auxílio.

Aos amigos que me acompanharam durante a graduação e que me ajudaram a fazer desse período mais uma etapa construtiva.

Aos envolvidos Bruno Ribeiro Freire, Igor Albuquerque de Sousa e a Prof^a. Dra. Eliana Fortes Gris pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A todos o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.1 Histórico da Cerveja: antiguidade, idade Medieval e idade contemporânea	9
1.2 Constituintes da cerveja: água, malte de cevada, lúpulo e levedura	11
1.3 Definição e classificação das cervejas.....	14
1.4 Processos de fabricação da cerveja: maltagem, mosturação, fervura, fermentação, maturação e engarrafamento	15
1.5 Cerveja artesanal e adição de frutas como adjunto cervejeiro	19
1.6 Imobilização de células de leveduras em alginato de cálcio	20
1.7 Benefícios do consumo moderado de cerveja	22
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVO GERAL	24
3.1 Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Matérias primas utilizadas na produção de cerveja	25
4.2 Fluxograma do processo de produção da cerveja	25
4.3 Brassagem (mosturação e fervura do mosto)	26
4.4 Adição de polpa de maracujá amarelo como adjunto cervejeiro	30
4.5 Fermentação	30
4.6 Maturação	32
4.7 Priming e engarrafamento	32
4.8 Análises físico-químicas	32
4.9 Imobilização das células de levedura em alginato	33
4.10 Cinética de fermentação alcoólica	34
4.11 Reuso das leveduras imobilizadas	34
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	36
5.1 Análises físico-químicas das matérias primas utilizadas na produção de cerveja (malte, bagaço de malte e polpa de maracujá amarelo)	36
5.2 Análises físico-químicas do mosto e das cervejas em todas as etapas de produção (cerveja verde, cerveja madura antes do engarrafamento e cerveja finalizada após engarrafamento).....	38
5.4 Avaliação da atividade de leveduras livres e leveduras imobilizadas em alginato de cálcio durante a cinética de fermentação alcoólica.....	43
5.5 Avaliação de células de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio durante diferentes reusos.....	46
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura recolhida em TepeGawra e datada de cerca de 4000 a.C.	10
Figura 2 – Foto do lúpulo: [A] Pellets e [B] Flor fêmea de lúpulo.....	13
Figura 3 – Conversão de glicose em etanol e CO ₂	14
Figura 4 - Fluxograma do processo da fabricação de cerveja.....	18
Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura demonstrando células de levedura aprisionadas dentro de uma matriz porosa de alginato de cálcio.....	21
Figura 6 – Fluxograma do processo de produção de cerveja.....	26
Figura 7 – Mosturação do malte realizada durante o processo de fabricação da cerveja artesanal	27
Figura 8 - Teste qualitativo do iodo para verificar a conversão de amido do malte em açúcares. A – Iodo, B – Iodo+Mosto, C – Iodo+Amido.....	28
Figura 9 – Lavagem do bagaço de malte realizada durante o processo de fabricação da cerveja artesanal.	29
Figura 10 – Lúpulos utilizados no processo de fabricação da cerveja artesanal.....	29
Figura 11 – Ativação da levedura seca no mosto cervejeiro.	31
Figura 12 – Fermentadores de 5 litros utilizados no processo de fabricação da cerveja artesanal.	31
Figura 13 – Leveduras imobilizadas em alginato de cálcio.	34
Figura 14 - Análises físico-químicas do mosto e da cerveja C.A.M.F (cerveja com adição de maracujá na fermentação) em todas as etapas da produção (mosto, ferm. = cerveja fermentada, mat. = cerveja madura e engar. = cerveja finalizada após engarrafamento).....	41
Figura 15 - Análises físico-químicas do mosto e da cerveja C.A.M.M (cerveja com adição de maracujá na maturação) em todas as etapas da produção (mosto, ferm. = cerveja fermentada, mat. = cerveja madura e engar. = cerveja finalizada após engarrafamento).....	42
Figura 16 – Análises físico-químicas da cinética de fermentação de levedura imobilizada em alginato de cálcio (L.I.A.) e de levedura livre (L.L.).....	44
Figura 17 – Consumo de açúcares redutores pelas leveduras livres e pelas leveduras imobilizadas em alginato durante 144 horas de fermentação alcoólica	45
Figura 18 – Análises físico-químicas dos fermentados alcoólicos após cada reuso .	46

Figura 19 – Consumo de açúcares por leveduras imobilizadas em alginato de cálcio durante os cinco reusos.	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes das águas dos diferentes tipos de cerveja (ppm).....	12
Tabela 2 – Composição centesimal do malte, bagaço seco e bagaço úmido.	36
Tabela 3 - Análises físico-químicas da polpa de maracujá amarelo.....	37
Tabela 4 – Análises físico-químicas do mosto.	39
Tabela 5 – Análises físico-químicas nas cervejas fermentadas e nas cervejas maturadas.	40
Tabela 6 – Análises físico-químicas nas cervejas engarrafadas	40
Tabela 7 - Atividade antioxidante equivalente em trolox (TEAC), quantificada pelos métodos de ABTS e DPPH.	43
Tabela 8 – Análises físico-químicas da cinética de fermentação de levedura imobilizada em alginato de cálcio (L.I.A.) e de levedura livre (L.L.).....	44
Tabela 9 – Análises físico-químicas dos fermentados alcoólicos após cada reuso ..	46

RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram o desenvolvimento de cerveja artesanal com polpa de maracujá amarelo e a avaliação da imobilização celular no processo de fermentação alcoólica. A cerveja foi preparada por meio dos processos de brassagem (mosturação e fervura do mosto), fermentação, maturação, priming e engarrafamento. O uso de polpa de maracujá resultou em duas formulações de cervejas, uma com adição de maracujá na fase de fermentação e outra com adição de maracujá na fase de maturação. Realizaram-se as análises físico-químicas para caracterização das cervejas. A imobilização das células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada em alginato de cálcio. Foram analisadas a cinética de fermentação e os reusos destas células imobilizadas no processo de fermentação alcoólica. Os resultados mostraram que o mosto apresentou 13°Brix e 7,83% de açúcares redutores e as cervejas apresentaram 6,0-6,3°Brix, 1,03-1,04% de açúcares redutores e teor alcoólico de 3,5-3,7°GL. O teor de compostos fenólicos totais das cervejas foram de 67 a 68mg/100mL. As cervejas apresentaram atividade antioxidante pelos métodos de ABTS (2448,75 a 3040,61 μ M TEAC) e DPPH (619,84 a 673,46 μ M TEAC) e a adição de maracujá na maturação da cerveja aumentou a atividade antioxidante. Nesse estudo, o uso do maracujá amarelo como adjunto cervejeiro resultou em cervejas com sabor pronunciado de maracujá e também contribuiu para o aumento dos compostos antioxidantes nos produtos finais. E, além disso, o uso de células imobilizadas de leveduras na etapa de fermentação alcoólica resultou na possibilidade de inovação tecnológica na produção de cerveja, com vantagens em relação ao uso de células livres como, repetida utilização e eliminação da operação de remoção de células de leveduras livres do produto. As leveduras imobilizadas se mantiveram ativas durante os 5 reusos e converteram a maior parte dos açúcares do mosto em etanol nos fermentados alcoólicos.

Palavras-Chave: maracujá, fermentação alcoólica, imobilização celular, *Saccharomyces cerevisiae*, tecnologia de fermentação.

ABSTRACT

The objectives of this study were the development of artisanal beer with passion fruit and the evaluation of cell immobilization in the alcoholic fermentation process. The beer was prepared through the brewing process (mashing and wort boiling), fermentation, maturation, priming and bottling. The addition of passion fruit pulp resulted in two beer formulations, one with addition of passion fruit in the fermentation stage and another with the addition of passion fruit in the maturation stage. The physicochemical analyses to characterize the beers were performed. The immobilization of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells was performed in calcium alginate. The kinetics of fermentation and the reuses of the immobilized cells in the fermentation process were analyzed. The results showed that the wort presented 13°Brix and 7.83% of reducing sugars and the beers presented 6.0 to 6.3°Brix, 1.03 to 1.04% of reducing sugar and alcohol content of 3.5 to 3.7°GL. The content of phenolic compounds of the beers were 67-68mg/100mL. The beers had antioxidant activity by the methods of ABTS (2448.75 to 3040.61 TEAC μ M) and DPPH (619.84 to 673.46 μ M TEAC) and the addition of passion fruit in the maturation stage of beer increased antioxidant activity. In this study, the use of passion fruit resulted in beers with strong flavor of passion fruit and also contributed to the increase in antioxidant compounds in the final products. The use of immobilized yeast cells in the fermentation resulted in a possibility of technological innovation in the production of beer, with advantages over the use of free cells as repeated use and elimination of removing cell-free operation of the product. The immobilized yeast remained active during the five reuses and converted most of the sugars of the wort into ethanol.

Key words: passion fruit, alcoholic fermentation, cell immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation technology.

1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Histórico da Cerveja: antiguidade, idade Medieval e idade contemporânea

Desde a antiguidade há relatos da produção de cerveja pelo homem. Há 5500 a.C. foi confirmada a existência de bebidas alcoólicas fermentadas e especificamente de cerveja, por meio de análises químicas realizadas em depósitos residuais de um pote encontrado num campo arqueológico neolítico iraniano (CERVEJAS DO MUNDO, 2016).

No entanto, a prova arqueológica mais concreta que se tem relativa à produção de cerveja foi achada em inscrições rupestres oriundas da Mesopotâmia (mais precisamente da Suméria), referentes a um cereal chamado *emmer* (*Triticum dicoccum*) que se utilizava para produzir pão e uma bebida alcoólica similar à cerveja. Os pedaços de pães eram imersos em água e deixados para fermentar espontaneamente, através da ação de leveduras selvagens (CERVEJAS DO MUNDO, 2016; EBLINGER & NARZIB, 2012).

Ainda relacionado à civilização Mesopotâmica, foi encontrada numa placa de barro (recolhida em TepeGawra e datada de 4000 a.C.), uma figura onde se observam dois homens que bebem possivelmente cerveja de um pote, utilizando para isto longas palhas. As palhas eram tradicionalmente usadas para aspirar à bebida e evitar a ingestão dos resíduos de cereal, visto que nessa época o produto fermentado não passava pelo processo de filtragem (Figura 1) (CERVEJAS DO MUNDO, 2016; HORNSEY, 2003).

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

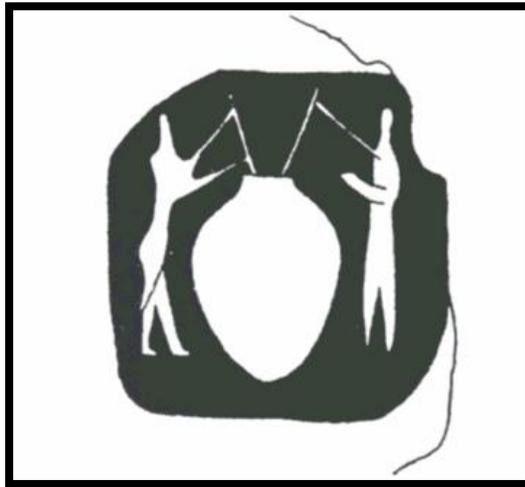


Figura 1 – Figura recolhida em TepeGawra e datada de cerca de 4000 a.C.

Fonte: HORNSEY, 2003.

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

A era Contemporânea teve seu início na revolução francesa que ocorreu nas últimas décadas do século XVII (1789 -1799) e neste período o modo de produção de cerveja sofreu mudanças decisivas durante a revolução industrial. Uma ampla variedade de cervejas apareceu durante o século XVII, sendo que cada variedade era definida pelos diversos ingredientes que eram incorporados, bem como pela qualidade da água presente na sua elaboração. Outro fato de grande destaque neste período (entre o século XVII e XVIII) foi a invenção da máquina a vapor por James Watt, em 1765, o que permitiu a industrialização da produção cervejeira (CERVEJAS DO MUNDO, 2016).

Já no século XIX, mais precisamente em 1870, Louis Pasteur, o precursor no processo de pasteurização, aplicou seu método pela primeira vez na produção de cerveja. Pouco tempo depois, na região europeia, as cervejarias passaram a adotar o processo de pasteurização como padrão em sua linha de produção. Ainda na

década de 1880, houve o acolhimento deste método pelas cervejarias da América (FONTANA, 2009).

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

Atualmente essas empresas se difundiram originando a Ambev, a maior empresa cervejeira do Brasil. Em 2004, a Ambev anunciou sua fusão com a cervejaria belga InterBrew, resultando na Interbev, o maior grupo cervejeiro do Mundo (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001). Segundo Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2014), o Brasil produziu 13,5 bilhões de litros de cerveja em 2013 e ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de produção, atrás apenas de China e Estados Unidos. No ano de 2013, as companhias produtoras de cerveja foram responsáveis por 2% do PIB nacional, gerando um faturamento de R\$ 70 bilhões, o que ressalta a grande importância da indústria cervejeira para a economia brasileira.

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

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

A água é o principal constituinte da cerveja respondendo por pelo menos 92% de sua composição. A qualidade da água é um fator determinante na qualidade da cerveja. Assim a água a ser utilizada durante a fabricação da cerveja deve satisfazer os requisitos de uma água potável (limpa, sem cheiro, sem cor e também não pode ter nenhum microrganismo nocivo à saúde) (BARROS & BARROS, 2010).

Além de satisfazer os requisitos de uma água potável, a água a ser utilizada na fabricação da cerveja deve também apresentar características específicas, tais como pH apropriado (sendo a faixa ideal para a produção de cerveja entre 6,5 a 7,0, variando de acordo com o tipo de cerveja a ser produzido) e uma concentração adequada de sais minerais como o cálcio. O nível de cálcio na água é importante para a estabilidade e sabor da cerveja. O cálcio estimula a ação enzimática das proteases e amilases, aumentando assim o teor de carboidratos fermentáveis e compostos nitrogenados no mosto (RIO, 2013; VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Os diferentes sais minerais presentes na água levaram os grandes centros cervejeiros a desenvolver tipos específicos de cerveja. Dessa forma a água com maior dureza (elevado teor de cálcio) tem sua associação com cervejas mais amargas como as do tipo Burton-on-Trent. Já a água que apresenta menor teor de cálcio é apropriada para fabricação de cervejas de sabor adocicado como as do tipo Dublin, Munique e Londres (Tabela 1). Nota-se ainda na Tabela 1, que a cerveja Dortmund é fabricada com uma água rica em íons cloreto, sulfato e bicarbonato. Enquanto que a cerveja do tipo Pilsen necessita de água com baixo teor de sais minerais para sua fabricação, ou seja, pobre em cálcio, magnésio, cloreto, sulfatos e bicarbonatos (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Tabela 1 – Constituintes das águas dos diferentes tipos de cerveja (ppm).

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

Fonte: CEREDA & FILHO, 2001, apud, HOUGH, 1985.

Outro componente essencial na fabricação da cerveja é a cevada. A cevada é uma gramínea da espécie *Hordeum vulgare*. O cultivo da cevada se dá em regiões de clima temperado. Na América do Sul, a Argentina é o grande produtor e o Brasil

também faz produções no Rio Grande do Sul durante o inverno. A composição da cevada em peso seco é de 70-85% de carboidratos (dos quais o amido corresponde a 50-63%), 7-13% de proteínas e 1-1,5% de lipídios. Para o processo de fabricação da cerveja, a cevada passa pelo processo de maltagem. A maltagem é a germinação controlada dos grãos e seu objetivo é desenvolver as enzimas amilases e proteases que serão responsáveis posteriormente por converter o amido em açúcares fermentescíveis e solubilizar as proteínas durante o processo de produção do mosto cervejeiro (RIO, 2013; SOARES, et al., 2007; YALCIN et al., 2007).

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma trepadeira perene originária de climas temperados, sendo bastante cultivada nos Estados Unidos e países do norte da Europa. No Brasil não existem condições climáticas adequadas à produção de lúpulo, por isso, todo o suprimento nacional é importado. As flores femininas da planta contêm a lupulina, que é um material resinoso, de sabor amargo, onde predominam resinas e taninos. O lúpulo tem dupla função, a aromática e a que propicia o sabor amargo. Os cachos florais são colhidos da trepadeira e as flores são secas e comercializadas principalmente na forma de pellets (ALMAGUER et al., 2014; MEGA, et al., 2011). A figura 2 apresenta o lúpulo na forma de pellets, processo em que as flores são secas e prensadas e na forma de flor.

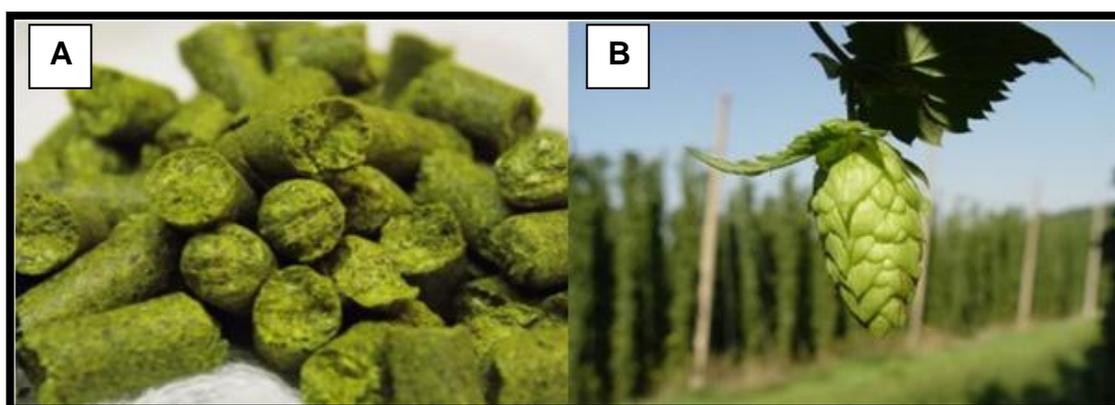


Figura 2 – Foto do lúpulo: [A] Pellets e [B] Flor fêmea de lúpulo.
Fonte: SIQUEIRA, 2014; CERVEZA, 2014.

As leveduras utilizadas no processo cervejeiro são as do gênero *Saccharomyces* (como *S. cerevisiae* e *S. uvarum*), que tem como função principal a conversão de açúcares fermentescíveis (como glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose) em etanol e gás carbônico e em menor quantidade em outros

subprodutos (como glicerol, acetaldeído, butilenoglicol, além de ácidos orgânicos como o succínico, acético e pirúvico). A conversão de açúcares em etanol e gás carbônico por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* é realizada devido à presença de enzimas (como as enzimas da via glicolítica, a piruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase), as quais promovem diversas reações que terminam por transformar a glicose (C₆H₁₂O₆) em etanol (CH₃CH₂OH) e gás carbônico (CO₂), em um processo exotérmico (LIMA & FILHO, 2011) (Figura 3).

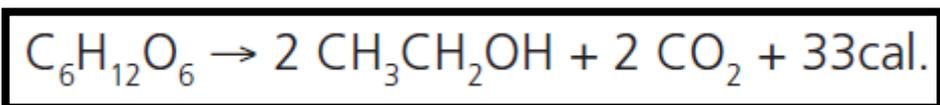


Figura 3 – Conversão de glicose em etanol e CO₂.
Fonte: LIMA & FILHO, 2011.

1.3 Definição e classificação das cervejas

No Brasil, a cerveja é definida por meio do Decreto Nº 6,871, de 04 de Junho de 2009, como a bebida obtida por meio da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro proveniente do malte de cevada e água potável, por ação de uma levedura cervejeira, com adição de lúpulo. Ainda dentro deste mesmo decreto a cerveja é classificada quanto, ao extrato primitivo, à cor, ao teor alcoólico, à proporção de malte de cevada e quanto à fermentação (BRASIL, 2009). Dentre as classificações da cerveja, a principal e mundialmente mais difundida é a relacionada com o tipo de fermentação, onde se tem dois grandes grupos, as cervejas do tipo Ale (alta fermentação) e as do tipo Lager (baixa fermentação) (ARAÚJO et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2008).

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

4 a 8% (ARAÚJO et al., 2003; BOTELHO, 2009; CARVALHO, 2007; SIQUEIRA et al., 2008).

As leveduras tipo Lager são utilizadas em temperaturas que podem variar de 7 a 15°C, com duração do processo de fermentação alcoólica de 10 a 15 dias. Nessas temperaturas mais baixas, a levedura tem seu metabolismo de forma mais lenta, e ocorre menos formação de espuma superficial no processo de fermentação alcoólica. Por isso as leveduras tendem a se sedimentar no fundo do fermentador, sendo assim, denominadas leveduras de baixa fermentação. A temperatura e o tipo de levedura têm grande influência no sabor final da cerveja. Devido às baixas temperaturas usadas no processo, os sabores e aromas das cervejas Lager são mais suaves em comparação com as Ales (ARAÚJO et al., 2003; BOTELHO, 2009; CARVALHO, 2007; SIQUEIRA et al., 2008).

1.4 Processos de fabricação da cerveja: maltagem, mosturação, fervura, fermentação, maturação e engarrafamento

Após passar por um processo de germinação em condições controladas a cevada recebe o nome de malte. Malte é um termo técnico utilizado para definir a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal sob condições controladas. Quando não há indicação, se subentende que é feito de cevada e em qualquer outro caso, é acrescentado o nome do cereal, por exemplo: malte de trigo, malte de centeio e de outros cereais. O objetivo deste processo é desenvolver enzimas e modificar o amido tornando-o mais macio e solúvel (REBELLO, 2009).

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

Na molha, a cevada limpa e classificada é submersa em água até obter o teor de umidade desejado, que possibilitará o início da germinação do embrião e a correspondente produção de ácido giberélico. O ácido giberélico por meio de transporte e ação na camada de aleurona facilita em conjunto com a hidratação do endosperma a modificação enzimática do grão. De forma simultânea, esta etapa também permite uma limpeza adicional do grão de cevada (MARTINS & RODRIGUES, 2015). O processo é finalizado em aproximadamente dois dias quando um teor de umidade de 42-48% é alcançado e neste ponto há o aparecimento da radícula (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Após macerada, a cevada é colocada então para germinar em compartimentos apropriados. Para que o ar úmido ascendente ou descendente atravesse à cevada é comum que os germinadores apresentem fundo falso perfurado, cuja espessura varia, dependendo do processo adotado. Usualmente essa etapa é encerrada quando a estrutura embrionária atinge dois terços do comprimento do grão. O tempo requerido nesta fase pode variar de 3 a 6 dias dependendo dos equipamentos utilizados (CARVALHO, 2007; VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

O processo de secagem dos grãos de malte é realizado após o processo de germinação. Assim como na germinação, esse processo também ocorre em compartimentos (denominados secadores), os quais apresentam fundo falso e perfurado, para facilitar a passagem do fluxo de ar. O processo de secagem é dividido em três etapas, onde a temperatura varia respectivamente de 49–60°C para 70°C e 88–100°C, tendo uma diminuição de umidade dos grãos de 45% para 4-5% no malte de cerveja Lager e 2-3% no malte de cerveja Ale. É nesta fase que se incorpora a maior parte do sabor característico do malte ao grão (CARVALHO, 2007; VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

O processo de maltagem é realizado em instalações dedicadas a este propósito, conhecidas como maltarias, que podem ou não ser anexas às indústrias cervejeiras. A cevada deve germinar fácil e uniformemente durante a fase de maltagem. O teor ideal de proteínas deve estar entre 9,5 e 11,5%. O poder amilolítico das enzimas deve ser suficiente para hidrolisar todo amido do malte e dos adjuntos (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Dentro da indústria cervejeira, o processo de fabricação pode ser dividido nas etapas de mosturação, fervura do mosto, fermentação, maturação e engarrafamento (Figura 4). A mosturação consiste em misturar o malte moído e água, em dornas com controle de temperatura que iniciam o processo a baixas temperaturas e vão aquecendo por etapas até 75°C. Quando a temperatura estiver a 50°C, estarão agindo as proteases, na temperatura de 60–65°C ocorre a sacarificação do amido gelificado pela β -amilase e a 70-75°C ocorre a dextrinização do amido pela α -amilase. O produto final da mosturação é o mosto cervejeiro que pode ser definido como uma solução, em água potável, de carboidratos, açúcares simples, proteínas, aminoácidos e sais minerais, resultantes da degradação enzimática dos componentes da matéria-prima que compõem o mosto (CARVALHO, 2007; SANTOS & RIBEIRO, 2005).

Ao final da mosturação, procede-se à filtração do mosto, por gravidade, através das cascas do malte que formam uma cama no fundo da dorna. Após a filtragem, o mosto é levado à fervura nas dornas, durante 2 horas. As operações de mosturação e de fervura são designadas de brassagem na cervejaria. Na fervura do mosto ocorre estabilização biológica (os micro-organismos que possam ter sido introduzidos nas operações anteriores são destruídos); estabilização bioquímica (as enzimas que se mantiveram ativas são inativadas) e estabilização físico-química (as proteínas de maior peso molecular são desnaturadas, precipitam e, com elas, arrastam os polifenóis, tornando o mosto mais limpo). Muitas vezes, o lúpulo é acrescentado quando a fervura está no meio ou mesmo no final. A razão é que os óleos essenciais do lúpulo responsáveis pelo desenvolvimento do aroma são voláteis, podendo perder-se na fervura prolongada (CARVALHO, 2007; SANTOS & RIBEIRO, 2005).

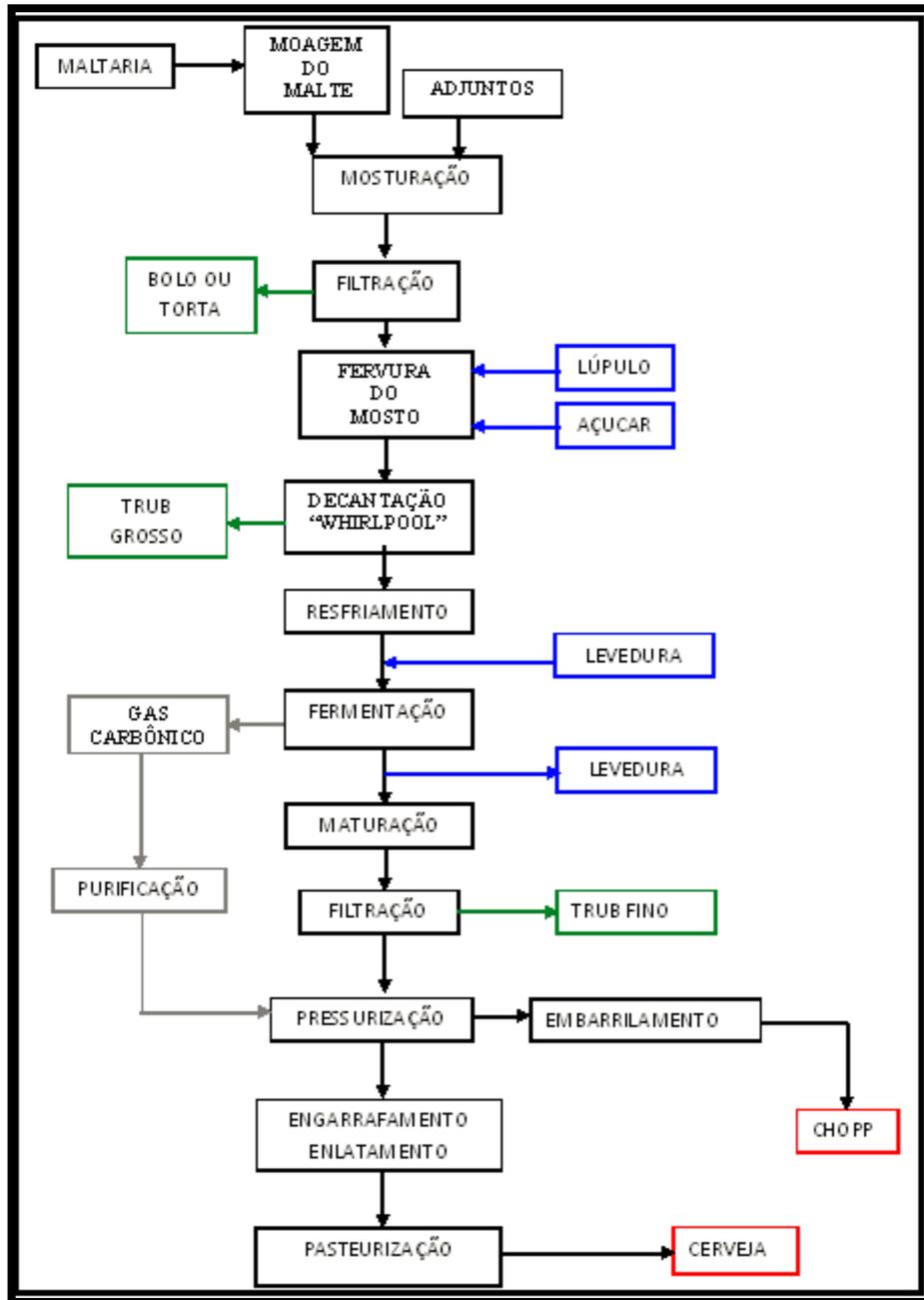


Figura 4 - Fluxograma do processo da fabricação de cerveja.

Fonte: MATOS, 2011.

Após a fervura, o mosto é centrifugado, resfriado e aerado para se fazer a inoculação da levedura cervejeira. Durante a fermentação principal, ocorre a utilização dos açúcares pelas leveduras e produção de CO₂ e álcool. Após a fermentação principal, a cerveja verde ainda possui uma suspensão de leveduras e deve passar pela etapa de maturação. A maturação é um repouso prolongado da cerveja a temperaturas baixas (0 a 3°C durante um período de 15 a 60 dias), que

contribui para a clarificação da cerveja e melhoria do sabor final. Na maturação há precipitação de proteínas e leveduras; o amargor do lúpulo se atenua e o sabor da cerveja madura se estabelece (CARVALHO, 2007; MATOS, 2011; SANTOS& RIBEIRO, 2005).

A seguir são feitas a clarificação (filtração) e a carbonatação, como operações de acabamento da cerveja. Com o objetivo de remover impurezas que ainda não se decantaram e proporcionar a limpidez final do produto, procede-se a filtração da cerveja após a maturação. O teor de CO₂ existente na cerveja ao final do processo não é suficiente para atender as necessidades do produto. Desta forma, realiza-se a carbonatação da mesma, por meio da injeção do gás carbônico. Após a carbonatação, a cerveja pronta é enviada para envase em barris (chopp) ou é enviada para engarrafamento e pasteurização (cerveja). (CARVALHO, 2007; MATOS, 2011; SANTOS & RIBEIRO, 2005).

1.5 Cerveja artesanal e adição de frutas como adjunto cervejeiro

As microcervejarias nacionais possuem uma escala de produção na média de 4.160 litros por mês de cerveja e segundo a ABRABRE (2013), aproximadamente 1% da produção nacional é de responsabilidade das microcervejarias, que se concentram principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil. A cerveja artesanal é caracterizada como um produto de excelente qualidade e alto valor de mercado, possuindo aromas e sabores diferentes e está voltada a um mercado-consumidor que busca produtos diferenciados e prioriza um produto de melhor qualidade sensorial (ARAÚJO et al., 2003).

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

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

O maracujá amarelo também conhecido como maracujá azedo (*Passiflora edulis F. Flavicarpa* Deg) é uma fruteira tropical nativa, cujo cultivo tem evoluído rapidamente no País. Atualmente o Brasil é o maior produtor e consumidor deste fruto, que pode ser aproveitado in natura e para a indústria de sucos. Devido ao seu aroma agradável e sabor característico, o maracujá é muito apreciado pelos brasileiros e considerado um fruto tropical de sabor exótico no mundo. Além disso, esse fruto tem excelentes propriedades nutricionais, sendo uma boa fonte de provitamina A, niacina, riboflavina e ácido ascórbico (CAMPOS, 2013; TUPINAMBÁ et al., 2007; VERAS et al., 2000).

1.6 Imobilização de células de leveduras em alginato de cálcio

De forma geral, enzimas e microrganismos livres no meio reacional estão sujeitos à inativação por fatores diversos, podendo ser estes de origem química, física ou biológica, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Desta forma, há necessidade de se estabilizar estes biocatalisadores, como meio de evitar a inativação ou diminuição de sua ação desejada (NASCIMENTO, ZANOTTO, & MELEGARI, 2002). Uma alternativa tecnológica encontrada para aperfeiçoar a ação de organismos celulares como fungos, leveduras ou bactérias é a imobilização celular. A imobilização celular é feita de maneira que seja preservada a atividade catalítica desejada e tem sua utilização tanto em escala laboratorial, quanto industrial. A tecnologia da imobilização celular se restringe à produção de metabólitos extracelulares ou a utilização de microrganismos como biocatalisadores (COVIZZI et al., 2007).

Assim, outra possibilidade de inovação na produção de cerveja é o uso de células de leveduras imobilizadas na etapa de fermentação alcoólica. Existem

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

O uso de imobilização celular em alginato de cálcio tem chamado grande atenção, devido principalmente as suas características intrínsecas, como biocompatibilidade, porosidade e facilidade de manipulação. Devido a essas propriedades, o alginato é um dos suportes mais utilizados como matriz para o aprisionamento e/ou liberação de uma variedade de proteínas e células (DUARTE, 2011; DUARTE et al., 2013). A imobilização celular por aprisionamento em uma matriz porosa é baseada na inclusão de organismos celulares no interior de uma rede rígida, impedindo desta forma que as células se difundam para o meio exterior, permitindo simultaneamente a transferência de nutrientes e metabólitos (OLIVEIRA, 2010), como se pode observar na Figura 5.

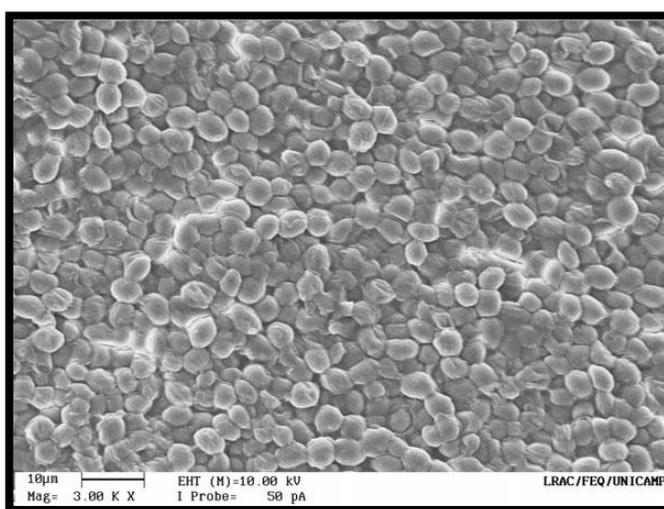


Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura demonstrando células de levedura aprisionadas dentro de uma matriz porosa de alginato de cálcio.

Fonte: DUARTE et al., 2013.

1.7 Benefícios do consumo moderado de cerveja

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

A cerveja é uma bebida que possui capacidade antioxidante moderada, devido à presença de compostos fenólicos. A capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, porém inferior à do vinho tinto (SIQUEIRA et al., 2008). Segundo estudo realizado por Gorinstein et al. (2000) a concentração de procianidinas, epicatequinas e ácido ferúlico é significativamente maior na cerveja quando comparada ao vinho branco, conferindo à cerveja boa capacidade antioxidante.

Entre os antioxidantes consumidos nos alimentos, os compostos fenólicos costumam serem os mais abundantes nas dietas. Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo e consequentemente o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (VIEIRA, 2013). Estudos epidemiológicos sugerem associações entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a prevenção de muitas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (HAMINIUK et al., 2012).

Além de dos antioxidantes fenólicos funcionarem como sequestradores de radicais livres, algumas vezes também funcionam como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica (HAMINIUK et al., 2011).

Devido à sua capacidade antioxidante e baixo teor alcoólico, o consumo moderado de cerveja é considerado benéfico à saúde (SIQUEIRA et al 2008).

2. JUSTIFICATIVA

A cerveja artesanal é caracterizada como um produto de excelente qualidade e alto valor de mercado, possuindo aromas e sabores diferentes e está voltada a um mercado-consumidor que busca produtos diferenciados e prioriza um produto de melhor qualidade sensorial. Esse estudo se justifica pela busca de novas formulações de cervejas com a adição de frutas tropicais brasileiras como o maracujá, visando obter um produto diferenciado para o mercado consumidor.

A segunda parte deste estudo buscou inovação tecnológica na área de produção da cerveja através do uso de leveduras imobilizadas. As leveduras imobilizadas apresentam vantagens em relação às leveduras livres como repetida utilização e eliminação do processo da operação de remoção de células livres.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivos principais o desenvolvimento de cerveja artesanal, com adição de maracujá na fermentação e na maturação e a avaliação da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica.

3.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver a cerveja artesanal com adição de fruta.
- Realizar análises físico-químicas no malte e no bagaço de malte.
- Realizar análises físico-químicas no mosto, cerveja verde, cerveja maturada e cerveja engarrafada.
- Avaliar a capacidade antioxidante da cerveja engarrafada.
- Comparar as cervejas com adição de maracujá na fermentação e na maturação.
- Avaliar a atividade das leveduras imobilizadas em alginato de cálcio em comparação com leveduras livres durante a cinética de fermentação.
- Avaliar a atividade de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio durante vários reusos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias primas utilizadas na produção de cerveja

A levedura utilizada para realizar a fermentação foi uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* obtida comercialmente (levedura Ale Safale S-04 Fermentis®). O malte e o lúpulo foram adquiridos de um fornecedor (Alquimia da Cerveja Microcervejaria LTDA, Porto Alegre, RS). Foram utilizados três tipos de malte: Pilsen (1,8 kg), Castle Viena (0,1 kg) e Castle Munich (0,1 kg). Os grãos de malte de cevada foram comprados já moídos pelo fornecedor. Foi utilizado lúpulo da espécie SAAZ T-90 04.00% AR (20 g).

4.2 Fluxograma do processo de produção da cerveja

Todas as etapas de produção da cerveja foram descritas na Figura 6. Como ponto inicial foi adquirido o Kit de malte (composto por malte Pilsen, Castle Viena e Castle Munich) e foram realizados os processos de mosturação, recirculação e lavagem do mosto, fervura do mosto (com adição de lúpulo) e finalmente o resfriamento do mosto. Seguiu-se então para os processos de fermentação alcoólica, maturação, priming e engarrafamento, onde em cada etapa foram retiradas alíquotas para posteriores análises físico-químicas, levando ao produto final cerveja.

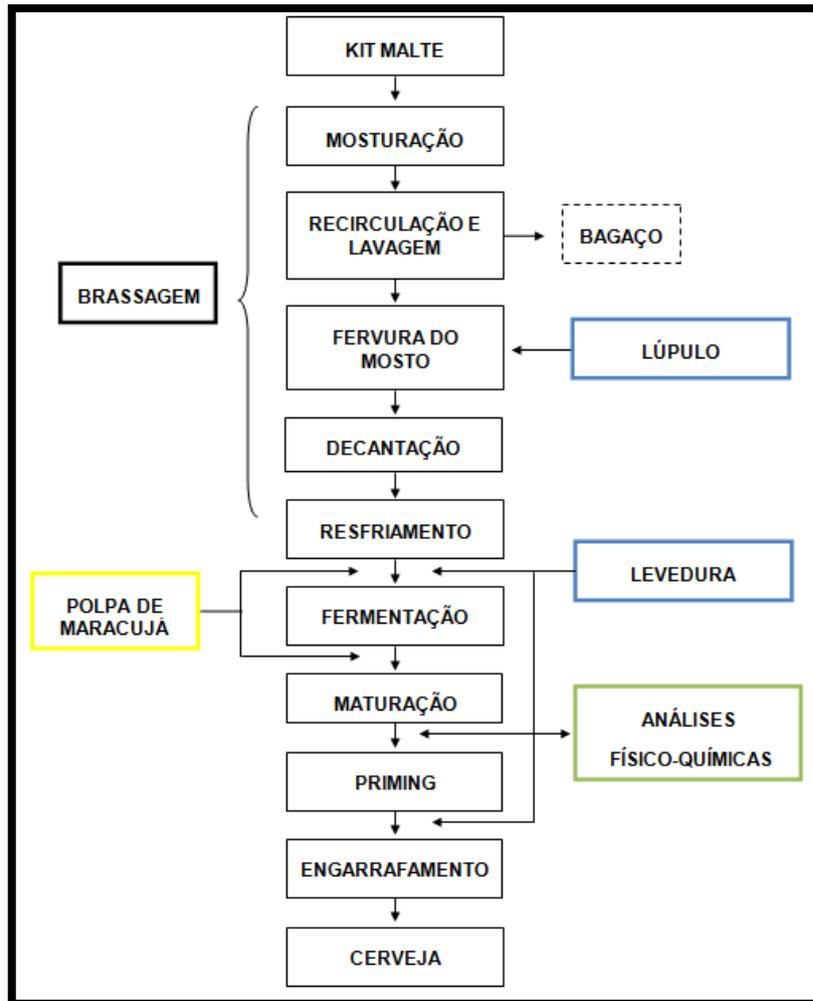


Figura 6 – Fluxograma do processo de produção de cerveja.

4.3 Brassagem (mosturação e fervura do mosto)

Durante o processo de brassagem, com intenção de se produzir 10 litros de mosto cervejeiro pesaram-se 2 Kg de malte moído e utilizaram-se 6 litros de água mineral no processo. O restante de água (4 litros) foi separado para as etapas posteriores de lavagem do malte e para a correção do volume final de mosto.

Em uma panela grande com torneira embutida foram aquecidos 6 litros de água mineral. A temperatura foi controlada até atingir 65°C e adicionou-se o malte triturado dentro de uma bolsa para cozimento e coagem de grãos (Figura 6). A temperatura foi mantida na faixa de 65 até 75°C. O mosto foi homogeneizado a cada 5 minutos durante 1 hora, para equalizar a temperatura da superfície e do fundo da

panela. Durante a operação de mosturação, ocorreu o processo enzimático de transformação do amido contido no malte em maltose e outros açúcares.



Figura 7 – Mosturação do malte realizada durante o processo de fabricação da cerveja artesanal

Após 1 hora de mosturação, efetuou-se o teste qualitativo do iodo para verificar se a conversão do amido do malte em açúcar ocorreu satisfatoriamente. Também foi medido o teor de sólidos solúveis do mosto em refratômetro de bancada. Para a execução do teste do iodo, foi recolhida uma amostra do mosto e com ajuda de uma pipeta de Pasteur foram pingadas quatro gotas de mosto e uma gota de lugol em uma placa de vidro. O iodo tem a propriedade de reagir com o amido, mudando de cor e ficando azul escuro. À medida que o amido se transforma em açúcar, o iodo reage cada vez menos e a reação resultante deste teste vai ficando cada vez mais alaranjada. Quanto mais alaranjada a reação, mais completa foi à conversão do amido do malte em açúcares. A figura 8 apresenta o teste qualitativo do iodo deste estudo, mostrando que a conversão de amido em açúcares foi satisfatória.

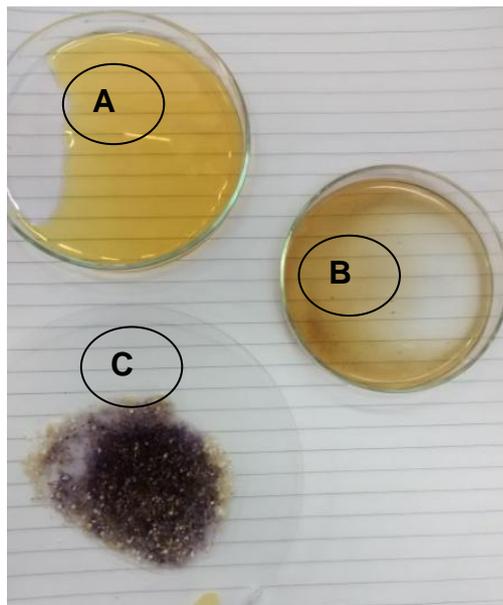


Figura 8 - Teste qualitativo do iodo para verificar a conversão de amido do malte em açúcares. A – Iodo, B – Iodo+Mosto, C – Iodo+Amido.

Na etapa seguinte fez-se a recirculação do mosto. A recirculação do mosto consistiu em lavar o bolo de grãos de malte com o próprio mosto, a fim de se retirar o máximo de açúcares do meio dos grãos. Para execução desta etapa, abriu-se a torneira da panela e encheu-se um béquer de 1 litro com o mosto. Em seguida, verteu-se o mosto sobre os grãos de malte usando uma escumadeira. O processo de recirculação foi repetido por 30 vezes.

Após a etapa de recirculação do mosto, procedeu-se a etapa de lavagem do bagaço de malte (Figura 9). Para execução desta etapa, abriu-se a torneira da panela e recolheu-se a maior parte do mosto em vários béqueres de 1 litro, até que os grãos de malte começaram a aparecer dentro da panela. A partir deste ponto, iniciou-se o processo de lavagem do bagaço de malte usando 2,5 litros da água previamente separada para lavagem e aquecida a 80°C. A lavagem tem a função de extrair o máximo de açúcares que ainda possam estar presentes no bagaço de malte.



Figura 9 – Lavagem do bagaço de malte realizada durante o processo de fabricação da cerveja artesanal.

Após a etapa de lavagem, o bagaço do malte foi descartado e o mosto foi recolocado dentro da panela para a etapa seguinte de fervura do mosto. O mosto foi fervido por 1 hora e durante a fervura realizou-se as adições de lúpulo em três tempos diferentes. O lúpulo de 1ª Adição foi adicionado após 15 minutos do início da fervura; o lúpulo de 2ª Adição foi adicionado após 30 minutos do início da fervura e o lúpulo de 3ª Adição foi adicionado após 45 minutos do início da fervura (Figura 10).



Figura 10 – Lúpulos utilizados no processo de fabricação da cerveja artesanal

Após a etapa de fervura do mosto, foi realizada a correção do volume final do mosto com adição de água e com auxílio de um refratômetro de bancada. O teor de sólidos solúveis do mosto encontrou-se elevado após a etapa de fervura devido à evaporação de parte da água, então se fez necessário à adição de água para diluição do mosto até atingir o teor de sólidos solúveis adequado para o processo de fermentação. Nesse estudo, o mosto foi corrigido para um teor de sólidos solúveis de 13°Brix e o volume final obtido foi de 9 litros.

O resfriamento do mosto até a temperatura de 25°C foi realizado com auxílio de um trocador de calor de alumínio. O mosto resfriado foi filtrado com uma peneira de aço inox para eliminar resíduos de cascas de bagaço de malte e de lúpulo e seguiu para o processo de fermentação.

4.4 Adição de polpa de maracujá amarelo como adjunto cervejeiro

O maracujá amarelo foi adquirido em supermercado da cidade de Brasília no período de Março a Abril de 2016. No laboratório, os frutos foram sanitizados em hipoclorito de sódio e lavados em água corrente antes do uso. Os frutos foram despulpados com auxílio de colher e peneira de aço inox e as sementes foram descartadas. A polpa de maracujá foi aquecida até a fervura em micro-ondas antes do uso. A adição de polpa de maracujá na cerveja artesanal foi realizada de 2 formas: no mosto cervejeiro antes da etapa de fermentação alcoólica e na cerveja verde, após a fermentação alcoólica e antes da etapa de maturação. Utilizou-se o volume de 40 mL de polpa de maracujá para cada 2 litros de mosto ou de cerveja verde.

4.5 Fermentação

Aproximadamente 30 minutos antes de se iniciar o processo de fermentação, foi realizada a ativação da levedura seca. Para isso, encheu-se um béquer com 1 litro de mosto e pesou-se 6 g de levedura seca. A levedura foi adicionada ao mosto e foi bem homogeneizada (Figura 11). O processo foi realizado em capela de fluxo laminar para evitar contaminação.



Figura 11 – Ativação da levedura seca no mosto cervejeiro.

Para o processo de fermentação, o mosto foi introduzido em garrafas plásticas de 5 litros (Figura 12). Foram utilizadas 2 garrafas de fermentação, sendo que uma garrafa recebeu 2 litros de mosto e 40 mL de polpa de maracujá e a outra garrafa recebeu somente 2 litros de mosto. Adicionou-se o fermento (levedura ativada) em ambos os fermentadores, agitando-os levemente para a aeração da mistura. Em seguida confeccionou-se um Airlock com mangueira para cada fermentador, de modo a permitir a saída de CO₂ e impedir a entrada de oxigênio durante a fermentação alcoólica, evitando assim, contaminação microbiana externa. Os fermentadores foram incubados em câmara climática a 20°C por 10 dias.



Figura 12 – Fermentadores de 5 litros utilizados no processo de fabricação da cerveja artesanal.

4.6 Maturação

Após 10 dias de fermentação alcoólica, os fermentadores foram retirados da câmara climática e a cerveja verde foi trasfegada com auxílio de uma bomba de vácuo para garrafas previamente higienizadas. No fim do processo de fermentação alcoólica, as leveduras se sedimentaram ao fundo do fermentador e na trasfega esse sedimento foi eliminado. Após a trasfega realizou-se a adição de 40 mL de polpa de maracujá na cerveja verde que foi fermentada somente com mosto. Para o processo de maturação, as cervejas verdes foram colocadas em refrigerador a 5°C por 15 dias.

4.7 Priming e engarrafamento

Após 15 dias de maturação, as garrafas foram retiradas do refrigerador e a cerveja madura foi trasfegada com auxílio de uma bomba de vácuo para garrafas previamente higienizadas. Para o processo de carbonatação, foi efetuado o priming, com adição de 6 g de xarope de glicose e 2 mL de uma suspensão de leveduras para cada 400 mL de cerveja. Para o preparo da suspensão de leveduras, pesou-se 1 g de levedura seca em 10 mL de água. As cervejas foram engarrafadas em garrafas de vidro âmbar de 600 mL e lacradas com recravadora comum. Depois de lacradas e armazenadas, as garrafas foram deixadas a temperatura ambiente por no mínimo 15 dias para formação de gás carbônico.

4.8 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas nas matérias primas (malte, bagaço de malte e polpa de maracujá amarelo) e em todas as etapas da produção de cerveja (mosto, cerveja verde, cerveja madura antes do engarrafamento e cerveja finalizada após engarrafamento).

No maracujá, mosto e nas cervejas foram analisados pH, acidez total, sólidos solúveis, açúcares redutores. O pH foi determinado em pHmetro digital (AOAC, 2006). A acidez total foi determinada através da titulação com NaOH 0,1 N (IAL, 1985). O teor de sólidos solúveis (grau Brix) foi determinado por refratômetro de

bancada a 20°C. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ADNS ou ácido 3-5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959). Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912).

No malte e no bagaço de malte também foram determinados umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos e valor calórico. A análise de umidade foi determinada pela perda de peso do produto, submetido à secagem em estufa a 105°C durante 4 horas até peso constante e a análise de cinzas foi determinada pela perda de peso do produto, submetido à incineração a 550°C em forno tipo mufla (AOAC, 2006). Os lipídios totais foram determinados segundo o método de BLIGH & DYER (1959). Para determinação das proteínas foi utilizado o método do Biureto (GORNALL et al., 1949). O teor de carboidratos foi determinado por diferença, sendo subtraída de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas e o valor calórico total foi estimado conforme os valores de conversão de Atwater de 4 kcal g⁻¹ de proteínas, 4 kcal g⁻¹ de carboidratos e 9 kcal g⁻¹ de lipídios (WILSON et al., 1982).

Na cerveja finalizada após engarrafamento, a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (KIM et al., 2002) e ABTS (RE et al., 1999). O grau alcoólico das cervejas determinou-se com uso de alcoômetro de Gay-Lussac colocado diretamente em volume de 250 mL de destilado a 20°C (IAL, 1985). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores da média e desvio padrão.

4.9 Imobilização das células de levedura em alginato

Para realizar o processo de microencapsulação, uma suspensão de leveduras 1% (p/v) foi misturada com uma solução de alginato de sódio 4% (p/v) (Dinâmica[®]), previamente esterilizada. Para o preparo da suspensão de leveduras, pesou-se 1 g de levedura seca Ale Safale S-04 Fermentis[®] em 100 ml de água destilada estéril e homogeneizou-se bem com agitador magnético. A contagem de células nessa suspensão de leveduras foi realizada em câmara de Neubauer e estava em 10⁸ células/mL. Para o preparo da solução de alginato de sódio, pesou-se 4g de alginato em 100 mL de água destilada e a suspensão foi autoclavada a 121°C por 15 min. As soluções de alginato e levedura foram misturadas em partes iguais (1:1), rendendo

um volume final de 200 mL e o alginato nessa solução foi diluído para 2%. A mistura resultante foi gotejada em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% (p/v) previamente esterilizada, para a formação de esferas de 6,0 mm de diâmetro. As esferas imobilizadas foram mantidas por 12 horas no cloreto de cálcio na geladeira. Após 12 horas, as esferas foram retiradas do cloreto de cálcio e lavadas com água destilada para remover o excesso de cálcio (Figura 13).



Figura 13 – Leveduras imobilizadas em alginato de cálcio.

4.10 Cinética de fermentação alcoólica

A fermentação foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, usando 30 g leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto cervejeiro (preparado conforme o item 2.2) adicionado de 2 mL de polpa de maracujá. Para realizar um estudo comparativo, também foi preparado um ensaio com leveduras livres, onde se pesou 0,34 g de levedura seca que foi adicionada em 100 mL de mosto cervejeiro e 2 mL de polpa de maracujá. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura em 20°C. Para avaliar o processo de fermentação alcoólica, alíquotas de mosto fermentado foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 144 horas. As alíquotas foram analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis (grau Brix), pH e açúcares redutores, conforme as metodologias descritas no item 2.7.

4.11 Reuso das leveduras imobilizadas

No estudo do reuso das leveduras imobilizadas, a fermentação foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, usando 30 g leveduras imobilizadas, 100 mL de mosto cervejeiro (preparado conforme o item 2.2) e 2 mL de polpa de maracujá. O ensaio foi realizado em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática na temperatura em 20°C. Após 72 horas de incubação, as esferas foram filtradas, lavadas com água destilada e adicionou-se mosto fresco para uma nova etapa de fermentação. Foram realizados 5 reusos. Após cada reuso, as esferas foram pesadas e o fermentado alcoólico foi analisado quanto ao teor de sólidos solúveis (grau Brix), pH e açúcares redutores, conforme as metodologias descritas no item 2.7.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas das matérias primas utilizadas na produção de cerveja (malte, bagaço de malte e polpa de maracujá amarelo)

A tabela 2 apresenta os resultados da composição centesimal do malte de cevada seca e do bagaço de malte seco e úmido usados neste trabalho. O bagaço de malte foi o produto obtido após o processo de mosturação do malte. O bagaço de malte pode ser usado na indústria de ração animal, pois ainda apresenta teor significativo de carboidratos e proteínas em sua composição (CORDEIRO, 2011).

Tabela 2 – Composição centesimal do malte, bagaço seco e bagaço úmido.

Variáveis	Malte	Bagaço Seco	Bagaço Úmido
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Umidade (%)	5,88 ± 0,01	3,20 ± 0,35	70,63 ± 5,15
Cinzas (%)	2,22 ± 0,01	2,87 ± 0,10	0,86 ± 0,00
Lipídeos (%)	2,32 ± 0,04	3,89 ± 0,61	1,14 ± 0,00
Proteínas (%)	9,26 ± 0,24	6,31 ± 0,96	1,85 ± 0,00
Carboidratos Totais (%)	80,32	83,73	25,52
Valor calórico (Kcal/100g)	379,2	395,17	119,74

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

Foi obtido um baixo teor de umidade (5,88%) no malte deste trabalho. Venturini Filho & Cereda (2001) obtiveram valor similar de umidade de 5,52% no malte brasileiro. Valores mais altos de umidade foram encontrados nos trabalhos de Curi et al. (2008) e Sleiman & Venturini Filho (2004), de 8,2% e 9,0%, respectivamente. O trabalho de Curi et al. (2008) relacionou o elevado valor de umidade do malte ao transporte e armazenamento inadequados, enquanto que o trabalho de Sleiman & Venturini Filho (2004) considerou como fator responsável pela elevada umidade a estocagem do malte em câmara fria.

Os valores obtidos neste trabalho para a umidade do bagaço seco e do bagaço úmido foram, respectivamente, de 3,20% e 70,63%. Cordeiro (2011) obteve

teor de umidade de 75,45% para o bagaço úmido, enquanto Ascheri et al. (2007) encontraram teor de umidade de 75,60%. Segundo Ascheri et al. (2007) a alta umidade do bagaço de malte limita seu uso como ração animal, pois este está sujeito a rápida deterioração microbiana, sendo a secagem uma opção para aumentar seu prazo de validade. No estudo de Sousa et al. (2014) o bagaço de malte seco apresentou umidade de 4,31%.

O teor de proteínas obtido neste estudo para o malte foi de 9,26%. A porcentagem de proteínas no malte Pilsen descrita por alguns autores variou de 10 a 12% (PORTO, 2011 apud KUNZE, 1999). Para o teor de carboidratos totais do malte e do bagaço úmido, os valores obtidos neste estudo foram, respectivamente, de 80,32% e 25,52%. Na literatura são apresentados valores de carboidratos na cevada seca de 70 a 80%, enquanto que, para o bagaço úmido observou-se valor médio de 15,46% (CORDEIRO, EL-AOUAR & GUSMÃO, 2012; PORTO, 2011 apud TSCHOPE, 1999). O teor de proteínas e carboidratos no malte pode ter variações de acordo com a procedência e o tipo de malte.

A tabela 3 apresenta as análises físico-químicas da polpa do maracujá amarelo utilizado como adjunto na produção da cerveja.

Tabela 3 - Análises físico-químicas da polpa de maracujá amarelo.

Variáveis	Média ± DP
Acidez total (g de ácido cítrico/100 mL)	3,30 ± 0,04
pH	2,84 ± 0,14
Sólidos solúveis (°Brix)	12,00 ± 0,00
Açúcares redutores (%)	4,11 ± 0,04
Compostos fenólicos (mg/100 mL)	119,00 ± 4,00

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

Em relação aos resultados obtidos neste estudo para a polpa de maracujá amarelo, pode-se notar que a acidez total foi de 3,30 g de ácido cítrico para cada 100ml de polpa (g ac. cítrico/100mL) e o pH foi de 2,84. Resultados similares foram obtidos por Campos et al. (2013), com valor médio de 3,25 g ac. cítrico/100mL para acidez total e pH de 3,12 para os frutos de maracujá comercializados no município de Macapá, Amapá. Amaro et. al. (2002) analisaram a polpa fresca e pasteurizada

de maracujá amarelo, com resultados de 3,5 a 3,8 g ac. cítrico/100mL para acidez total e pH de 2,4 a 2,7.

Os resultados encontrados para o teor de sólidos solúveis e açúcares redutores na polpa de maracujá deste estudo foram de 12°Brix e 4,11%. Sipoli & Barros (2011) obtiveram resultados similares para a polpa de maracujá amarelo e reportaram valores de 11,7°Brix e 5,49% de açúcares redutores. Veras, Pinto & Meneses (2000), obtiveram valores de sólidos solúveis de 14,67 a 15,21°Brix e valores de açúcares redutores de 7,03 a 7,79% para os maracujás cultivados no Cerrado.

Em relação ao teor de compostos fenólicos na polpa de maracujá amarelo, o valor médio obtido foi de 119mg de ácido tânico/100mL. Vieira (2013) apresentou valores de compostos fenólicos de 234 a 249mgde equivalentes de catequina/100g para espécies de maracujás *P. Edullis ssp.* Kosloski & Canteri (2012), descrevem resultados de compostos fenólicos de 190 a e 560mg/100mL para os frutos de maracujá com uma semana de maturação pós-colheita.

Os valores de compostos fenólicos, açúcares redutores e teor de sólidos solúveis nos frutos maracujá amarelo podem sofrer variação considerando fatores como clima, região de plantio, período de colheita do fruto e estado de maturação (VERAS, PINTO & MENESES, 2000). No geral, pode se observar através dos estudos de composição que o maracujá é um fruto ácido, com teor moderado de açúcares redutores e com um teor significativo de compostos fenólicos totais.

5.2 Análises físico-químicas do mosto e das cervejas em todas as etapas de produção (cerveja verde, cerveja madura antes do engarrafamento e cerveja finalizada após engarrafamento).

Nesse estudo, após o processo de mosturação do malte de cevada, obteve-se um volume de mosto de 9 litros com um teor de sólidos solúveis de 13°Brix . A tabela 4 apresenta as análises físico-químicas do mosto cervejeiro.

Tabela 4 – Análises físico-químicas do mosto.

Variáveis	Média ± DP
Acidez total (g de ácido láctico/100 mL)	0,10 ± 0,02
pH	5,77 ± 0,04
Sólidos solúveis (°Brix)	13,00 ± 0,00
Açúcares redutores (%)	7,83 ± 0,12
Compostos fenólicos (mg/100mL)	99,00 ± 3,00

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

O mosto deste estudo apresentou baixa acidez total com valor médio de 0,10 g de ác. láctico/100 mL. Resultados similares foram reportados por Brunelli, Mansano & Venturini Filho (2014), onde o mosto apresentou acidez total de 0,15 g de ác. láctico/100 mL. Os valores médios de pH (5,77), sólidos solúveis (13° Brix) e açúcares redutores (7,83%) obtidos neste trabalho foram semelhantes aos descritos por Sleiman & Venturini Filho (2004), que obtiveram valores de pH de 5,60, sólidos solúveis de 12,1° Brix e açúcares redutores de 5,78% para o mosto cervejeiro. O valor médio de compostos fenólicos do mosto deste trabalho foi de 99mg/100mL. Segundo SIQUEIRA et al. (2008), no mosto cervejeiro cerca de 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% se originam do lúpulo.

Após 10 dias de fermentação alcoólica do mosto cervejeiro a 20°C, obteve-se a cerveja verde ou cerveja fermentada e após 15 dias de maturação de cerveja verde a 5°C obteve-se a cerveja maturada. Foram obtidas 2 formulações de cervejas. A adição de polpa de maracujá no mosto cervejeiro antes da etapa de fermentação alcoólica resultou na cerveja C.A.M.F (cerveja com adição de maracujá na fermentação) e a adição de polpa de maracujá na cerveja verde, após a fermentação alcoólica e antes da etapa de maturação, resultou na cerveja C.A.M.M. (cerveja com adição de maracujá na maturação). A tabela 5 apresenta as análises físico-químicas das cervejas fermentadas e das cervejas maturadas. E A tabela 6 apresenta os resultados das análises físico-químicas nas cervejas finalizadas após engarrafamento.

Tabela 5 – Análises físico-químicas nas cervejas fermentadas e nas cervejas maturadas.

Fermentada	Acidez Total (%)	pH	SST (°Brix)	AR (%)	CF (mg/100mL)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C.A.M.F.	0,23 ± 0,00	3,82 ± 0,01	6,00 ± 0,0	1,15 ± 0,04	91,00 ± 1,00
C.A.M.M.	0,29 ± 0,01	3,95 ± 0,04	6,00 ± 0,0	1,30 ± 0,04	91,00 ± 2,00
Maturada	Acidez Total (%)	pH	SST (°Brix)	AR (%)	CF (mg/100mL)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C.A.M.F.	0,28 ± 0,01	3,79 ± 0,02	6,00 ± 0,0	1,37 ± 0,03	83,00 ± 1,00
C.A.M.M.	0,26 ± 0,01	3,76 ± 0,01	6,30 ± 0,0	1,58 ± 0,03	84,00 ± 0,60

SST: Sólidos solúveis totais. AR: Açúcares Redutores. CF: Compostos Fenólicos. C.A.M.F.: Cerveja com Adição de Maracujá na Fermentação. C.A.M.M.: Cerveja com Adição de Maracujá na Maturação. Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

Tabela 6 – Análises físico-químicas nas cervejas engarrafadas

Variáveis	C.A.M.F.	C.A.M.M.
	Média ± DP	Média ± DP
Acidez total (%)	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,02
pH	3,66 ± 0,01	3,71 ± 0,02
Sólidos solúveis (°Brix)	6,00 ± 0,00	6,30 ± 0,00
Açúcares redutores (%)	1,03 ± 0,02	1,04 ± 0,01
Compostos fenólicos (mg/100 mL)	68,00 ± 2,00	67,00 ± 2,00
Teor alcoólico (°GL)	3,5	3,7

C.A.M.F.: Cerveja com Adição de Maracujá na Fermentação. C.A.M.M.: Cerveja com Adição de Maracujá na Maturação. Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata; DP = desvio padrão.

Os resultados deste estudo obtidos para as cervejas engarrafadas foram de 0,33% para acidez total e 3,6-3,7 para o pH. A adição de polpa de maracujá deixou as cervejas deste estudo um pouco mais ácidas (acidez total) que a cerveja obtida por Curi et al. (2008) que reportaram valores de 0,15% para acidez total e pH de 3,84 na cerveja tipo Pilsen sem adição de frutas. Sleiman & Venturini Filho (2004) obtiveram valores de 0,19% para acidez total e pH de 4,54 na cerveja de extrato de malte de cevada.

O teor de compostos fenólicos totais das cervejas engarrafadas deste estudo foram de 67 a 68mg/100mL. Freitas et al. (2006) reportaram valores decompostos fenólicos de 40 a 80mg/100mL para diferentes tipos de cerveja (cervejas de trigo

clara e escura, cervejas de cevada clara e escura de diferentes marcas). Segundo SIQUEIRA et al. (2008) a cerveja pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis, sendo os compostos fenólicos encontrados tanto no malte quanto no lúpulo. O ácido ferúlico é o principal ácido fenólico encontrado em cervejas, representando entre 48 e 58% do total de ácidos fenólicos e está presente na cevada. Outros compostos fenólicos encontrados na cerveja são a catequina e a quercetina. No estudo de RAMPAZZO (2014), a análise de identificação de compostos fenólicos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência identificou catequina, ácido ferúlico, rutina, ácido siríngico e ácido p-cumárico em quase todas as amostras de cervejas analisadas.

O teor alcoólico obtido para a cerveja com adição de maracujá na fermentação foi de 3,5°GL e para a cerveja com adição de maracujá na maturação foi de 3,7°GL. As cervejas produzidas com malte tipo Pilsen geralmente resultam numa cerveja de baixo teor alcoólico (entre 3 e 5°GL) (HORNSEY, 2003). Sleiman & Venturini Filho (2004), obtiveram teor alcoólico de 4,6°GL na cerveja de extrato de malte cevada.

As figuras 14 e 15 apresentam as variações das análises físico-químicas do mosto e das cervejas em todas as etapas da produção de cerveja (mosto, cerveja verde, cerveja madura antes do engarrafamento e cerveja finalizada após engarrafamento).

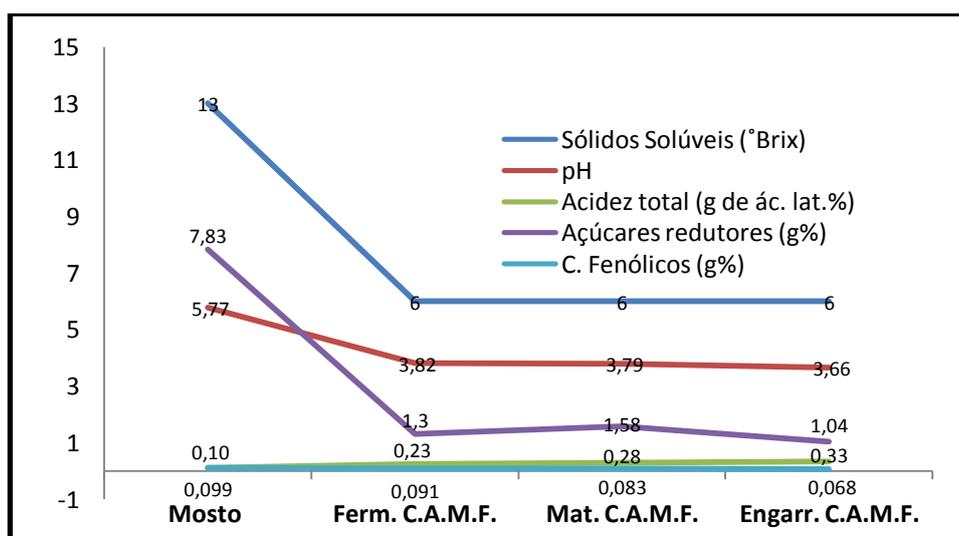


Figura 14 - Análises físico-químicas do mosto e da cerveja C.A.M.F (cerveja com adição de maracujá na fermentação) em todas as etapas da produção (mosto, ferm. = cerveja fermentada, mat. = cerveja madura e engarr. = cerveja finalizada após engarrafamento).

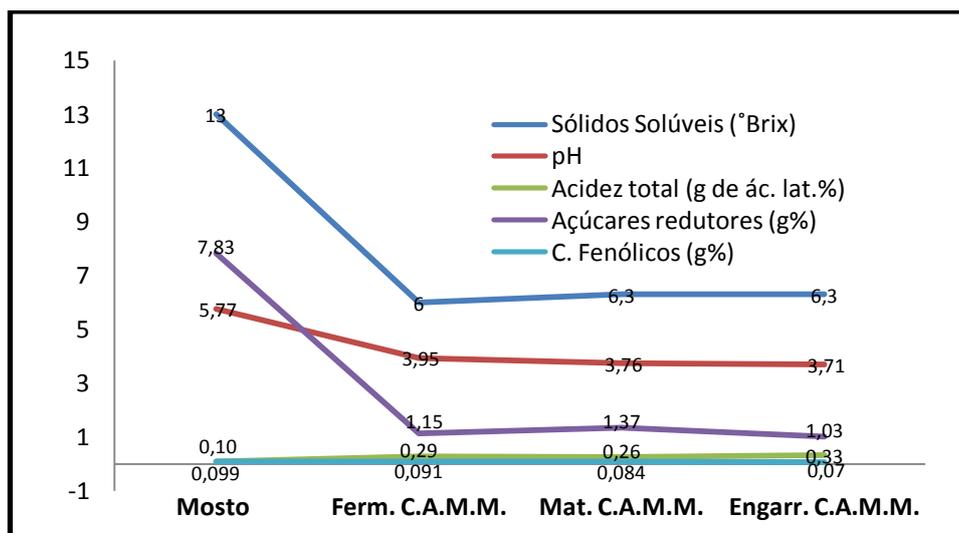


Figura 15 - Análises físico-químicas do mosto e da cerveja C.A.M.M (cerveja com adição de maracujá na maturação) em todas as etapas da produção (mosto, ferm. = cerveja fermentada, mat. = cerveja madura e engarr. = cerveja finalizada após engarrafamento).

Pode se observar nas figuras 14 e 15 que as cervejas tiveram boa tecnologia de fermentação, sendo que boa parte dos açúcares do mosto foram transformados em etanol. O mosto apresentou 13°Brix e 7,83% de açúcares redutores e as cervejas apresentaram 6,0-6,3°Brix, 1,03-1,04% de açúcares redutores e teor alcoólico de 3,5-3,7°GL.

Apesar das análises físico-químicas terem ficado com resultados semelhantes entre as cervejas com adição de maracujá na fermentação e com adição de maracujá na maturação, sensorialmente as cervejas apresentaram diferença. Ambas as cervejas apresentaram sabor de maracujá, porém a cerveja com adição de maracujá na maturação apresentou gosto mais pronunciado de maracujá e maior carbonatação. A adição de um volume pequeno de polpa de maracujá (40 mL de polpa para cada 2 litros de mosto ou de cerveja) foi uma precaução neste trabalho para obter uma cerveja com acidez adequada.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante da cerveja engarrafada pelos métodos de ABTS e DPPH

A tabela 7 apresenta os resultados da atividade antioxidante da cerveja com adição de maracujá na fermentação (C.A.M.F) e da cerveja com adição de maracujá na maturação (C.A.M.M).

Tabela 7 - Atividade antioxidante equivalente em trolox (TEAC), quantificada pelos métodos de ABTS e DPPH.

Variáveis	ABTS ($\mu\text{M TEAC}$)		DPPH ($\mu\text{M TEAC}$)	
	Média	D. Padrão	Média	D. Padrão
C.A.M.F.	2448,75 a	139,06	619,84 a	37,84
C.A.M.M.	3040,61 b	73,22	673,46 b	36,46

Letra: ANOVA, Teste de Tukey, significância de 5% (entre as duas amostras de DPPH, assim como, para as duas amostras de ABTS). Letras diferentes na mesma coluna implicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras pelo Teste de Tukey.

Nota-se que os resultados apresentados, tanto no método de ABTS, quanto no método de DPPH, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as cervejas, mostrando que a adição de maracujá durante a maturação da cerveja levou a um acréscimo na capacidade antioxidante. Os resultados de atividade antioxidante das cervejas deste estudo foram maiores que do estudo de Tafulo (2008), sugerindo que a adição de maracujá nas cervejas aumentou sua atividade antioxidante. Tafulo (2008) apresentou valores de atividade antioxidante para 27 amostras de cervejas comerciais, que variaram de 577 a 1189,5 $\mu\text{M TEAC}$ para o método de ABTS e de 121,6 μM a 553,4 $\mu\text{M TEAC}$ para o método de DPPH.

Segundo SIQUEIRA et al. (2008) a cerveja é uma bebida que possui capacidade antioxidante moderada, devido à presença de compostos fenólicos. A capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, mas inferior à do vinho tinto, além de possuir compostos antioxidantes diferentes, devido à composição do malte e do lúpulo diferir da composição das uvas.

5.4 Avaliação da atividade de leveduras livres e leveduras imobilizadas em alginato de cálcio durante a cinética de fermentação alcoólica

A cinética de fermentação alcoólica foi realizada usando leveduras imobilizadas em alginato de cálcio e leveduras livres adicionadas em 100mL de mosto cervejeiro e 2 mL de polpa de maracujá. A tabela 8 e a figura 15 apresentam as análises físico-químicas das alíquotas de mosto fermentado retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 144 horas de fermentação alcoólica.

Tabela 8 – Análises físico-químicas da cinética de fermentação de levedura imobilizada em alginato de cálcio (L.I.A.) e de levedura livre (L.L.)

Variáveis	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)
Controle*	4,70 ± 0,09	13,00 ± 0,0	6,53 ± 0,18
24 h – L.I.A.	3,65 ± 0,15	8,50 ± 0,56	3,10 ± 0,20
48 h – L.I.A.	3,33 ± 0,01	6,93 ± 0,06	2,37 ± 0,03
72 h – L.I.A.	3,36 ± 0,17	7,30 ± 0,00	2,31 ± 0,04
144 h – L.I.A.	3,47 ± 0,03	7,30 ± 0,00	2,31 ± 0,08
Variáveis	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)
24 h – L.L.	3,87 ± 0,03	8,40 ± 0,03	4,14 ± 0,45
48 h – L.L.	3,67 ± 0,0	8,60 ± 0,30	2,93 ± 0,09
72 h – L.L.	3,73 ± 0,02	8,40 ± 0,17	2,72 ± 0,01
144 h – L.L.	3,80 ± 0,01	8,60 ± 0,30	3,03 ± 0,01

*Controle é representado pelo mosto com adição de maracujá antes da inoculação de leveduras, como forma de controle do processo de fermentativo.

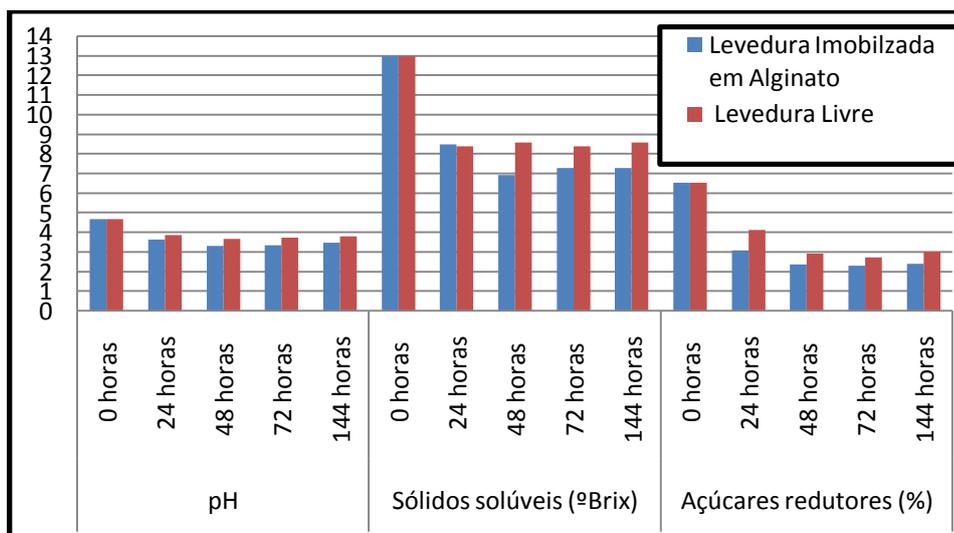


Figura 16 – Análises físico-químicas da cinética de fermentação de levedura imobilizada em alginato de cálcio (L.I.A.) e de levedura livre (L.L.)

Como pode ser observado na Tabela 8 e Figura 16 após 72 horas de fermentação, tanto para as leveduras imobilizadas quanto para as leveduras livres, a maior parte dos açúcares do mosto foi transformada em etanol. O mosto apresentou 13°Brix e 6,53% de açúcares redutores e as cervejas fermentadas apresentaram 7,3-8,5°Brix e 2,03-3,03% de açúcares redutores. No tempo de fermentação de 144 horas não houve alteração dos resultados, indicando que a fermentação já tinha se completado em 72 horas. Esses resultados podem ser comparados ao estudo de

Smogrovicova, Domeny & Svitel (2001), onde ao analisarem a cinética de fermentação de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* W-96 imobilizadas em alginato de cálcio, também se obteve finalização da fermentação alcoólica em 72 horas.

A Figura 17 apresenta o consumo dos açúcares redutores pelas leveduras imobilizadas e livres durante as 144 horas de fermentação alcoólica. Foi possível observar um consumo levemente maior de açúcares pelas leveduras imobilizadas em relação às leveduras livres. Almonacid et al (2012) não observaram diferenças significativas no consumo de glicose entre as leveduras micro-encapsuladas e a leveduras livres.

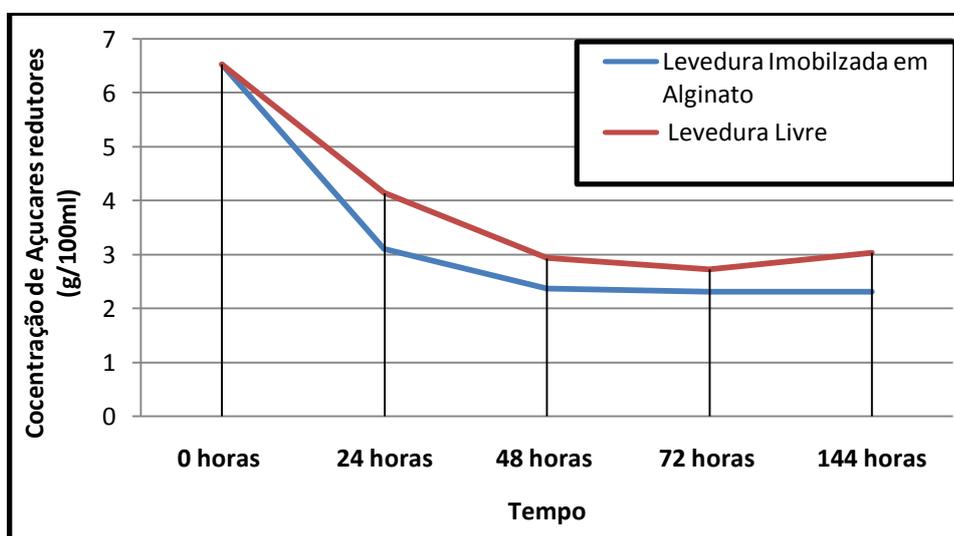


Figura 17 – Consumo de açúcares redutores pelas leveduras livres e pelas leveduras imobilizadas em alginato durante 144 horas de fermentação alcoólica

O alginato geralmente não é considerado como o melhor material para a fabricação de cerveja com leveduras imobilizadas. Este apresenta desvantagens conhecidas como, limites difusionais, alterações no metabolismo do fermento e estabilidade limitada. Porém, o alginato tem a vantagem de fácil utilização, além da simples preparação e obtenção de imobilização homogênea (SMOGROVICOVA, DOMENY & SVITEL, 2001).

5.5 Avaliação de células de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio durante diferentes reusos

No estudo do reuso das leveduras imobilizadas, a fermentação foi realizada usando leveduras imobilizadas e 100 mL de mosto cervejeiro com 2 mL de polpa de maracujá. Após 72 horas de incubação na temperatura em 20°C, as esferas foram filtradas e adicionou-se mosto fresco para uma nova etapa de fermentação alcoólica. Foram realizados 5 reusos. A Tabela 9 e Figura 17 apresentam os resultados de cada reuso, sendo que após cada reuso, as esferas foram pesadas e o fermentado alcoólico foi analisado quanto ao teor de sólidos solúveis (grau Brix), pH e açúcares redutores.

Tabela 9 – Análises físico-químicas dos fermentados alcoólicos após cada reuso

Variáveis	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Açúcares redutores (%)	Peso das células imobilizadas (g)
Controle*	4,70 ± 0,09	13,00 ± 0,00	6,53 ± 0,18	30,00 ± 0,20
1º Uso**	3,60 ± 0,01	8,60 ± 0,00	2,99 ± 0,09	28,01 ± 0,45
2º Uso**	3,85 ± 0,04	8,30 ± 0,30	2,78 ± 0,02	33,91 ± 0,39
3º Uso**	3,88 ± 0,07	8,60 ± 0,30	2,87 ± 0,12	43,59 ± 0,27
4º Uso**	3,76 ± 0,01	8,40 ± 0,17	2,68 ± 0,01	49,96 ± 0,23
5º Uso**	3,90 ± 0,11	8,40 ± 0,35	1,68 ± 0,17	52,59 ± 0,38

*Controle é representado pelo mosto com adição de maracujá antes da inoculação de leveduras, como forma de controle do processo de fermentativo. **Cada "Uso" teve tempo de fermentação de 72 Horas.

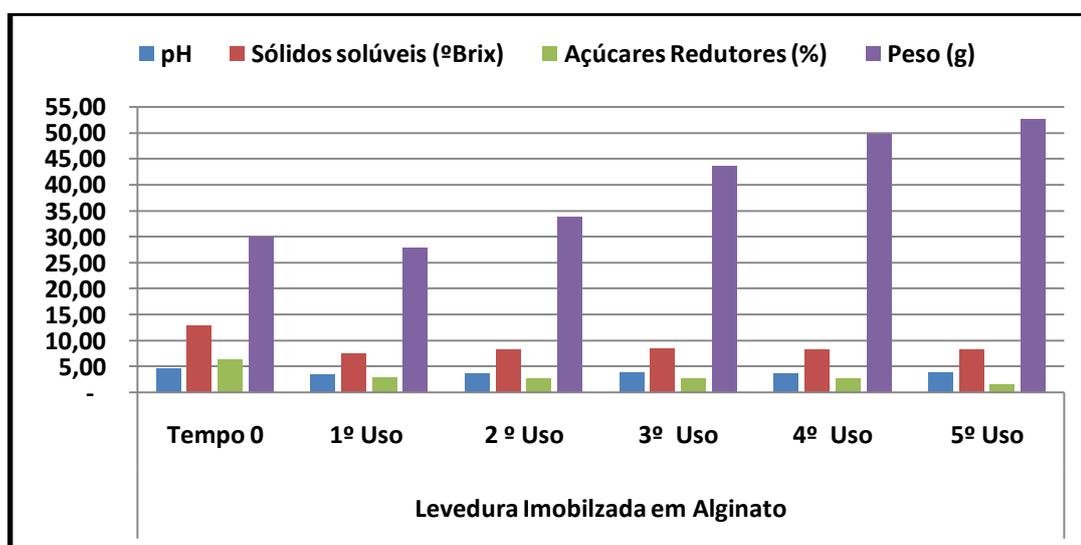


Figura 18 – Análises físico-químicas dos fermentados alcoólicos após cada reuso

Foi observado na Tabela 9 e Figura 18 que as leveduras imobilizadas se mantiveram ativas durante os 5 reusos e converteram a maior parte do mosto açucarado em etanol. A maior alteração durante os reusos foi o peso das células imobilizadas, que aumentou de 28,01g no primeiro uso para 52,59g no quinto reuso, evidenciando que as leveduras se multiplicaram no interior das esferas.

A figura 19 apresenta o consumo de açúcares pelas leveduras imobilizadas durante os cinco reusos. Nota-se de forma clara que a partir do 3º reuso o consumo de açúcares passou a ser maior e isso mostrou que possivelmente devido ao aumento acentuado das células de leveduras no interior das esferas, houve maior abertura de poros ou rachaduras no alginato e isso aumentou o contato das enzimas liberadas pelas leveduras com o mosto cervejeiro, levando ao maior consumo de açúcares fermentáveis.

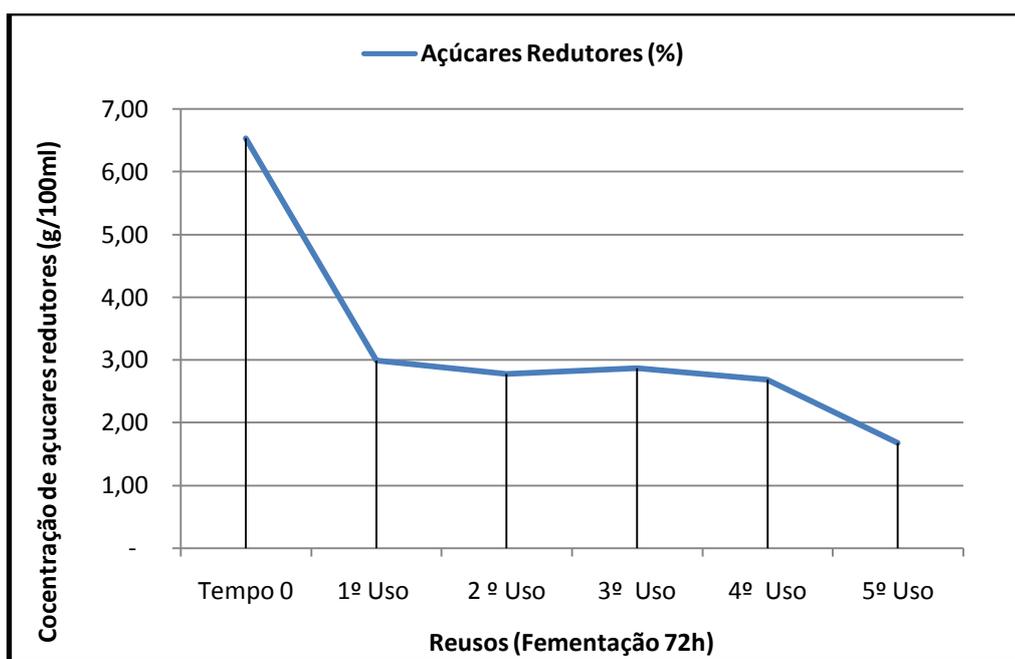


Figura 19 – Consumo de açúcares por leveduras imobilizadas em alginato de cálcio durante os cinco reusos.

Duarte et al. (2013), apresentaram em seu trabalho 8 ciclos de utilização de leveduras imobilizadas em alginato, em dois meios diferentes, um meio aquoso contendo glicose e outro meio aquoso contendo sacarose. Os autores observaram que o consumo de açúcares em ambos os meios foi menor no primeiro uso em relação aos demais usos. Neste trabalho foram observados resultados semelhantes

e este resultado pode ter relação com o fato de que no 1º uso as leveduras imobilizadas ainda se encontram em estado de adaptação e o contato com os nutrientes são menores, visto que, como ainda não houve multiplicação das leveduras no interior das esferas, os poros das esferas se encontram mais fechados.

No estudo de Duarte et al. (2013), os autores, obtiveram resultados melhores para consumo açúcares pelas leveduras livres, quando comparadas às leveduras imobilizadas, porém, os mesmos descrevem vantagens do uso de células imobilizadas, como, a reutilização celular e a produção equivalente de álcool em todos os ciclos.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, o uso do maracujá amarelo como adjunto cervejeiro resultou em cervejas com sabor pronunciado da fruta e também contribuiu para o aumento dos compostos antioxidantes nos produtos finais.

Nas análises físico-químicas, o malte apresentou 5,88% de umidade, 9,26% de proteínas e 80,32% de carboidratos totais. O mosto apresentou 13°Brix, 7,83% de açúcares redutores e 99mg/100ml de compostos fenólicos. As cervejas engarrafadas apresentaram teor alcoólico de 3,5-3,7°GL, 67-68mg/100ml de compostos fenólicos e 2448,75-3040,61µM TEAC de atividade antioxidante pelo método de ABTS.

Apesar das análises físico-químicas terem ficado com resultados semelhantes entre as cervejas com adição de maracujá na fermentação e com adição de maracujá na maturação, sensorialmente as cervejas apresentaram diferenças. A cerveja com adição de maracujá na maturação apresentou gosto mais pronunciado de maracujá e maior carbonatação.

O uso de células imobilizadas de leveduras na etapa de fermentação alcoólica resultou em vantagens em relação ao uso de células livres como repetida utilização e eliminação da operação de remoção de células livres do produto.

Na cinética de fermentação alcoólica, após 72 horas as leveduras imobilizadas em alginato finalizaram o processo e consumiram a maior parte dos açúcares do mosto (6,53% de açúcares redutores) transformando-o no fermentado alcoólico (2,31% de açúcares redutores). As leveduras imobilizadas se mantiveram ativas durante os 5 reusos e converteram a maior parte dos açúcares do mosto em etanol, resultando nos fermentados alcoólicos.

Nos estudos futuros, será realizada a análise sensorial das duas formulações de cervejas para avaliar a preferência dos avaliadores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRABRE. Categorias [Internet]. 2013. Disponível em: www.abrabe.org.br_Acesso em: 02/05/16.
- 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.
- ALMONACID, S. F. et al. A Comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 750–758, 2012.
- AMARO, A. P.; BONILHA P. R. M.; MONTEIRO, M. Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e microbiológicas da polpa de maracujá. **Alimentos e Nutrição**, v. 13, p. 151-162, 2002.
- AOAC - Official methods of analysis, Washington, 18 ed., 2006.
- ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Sensorial and physical-chemical evaluation of beers deriving from two segments of Brazilian market. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2003.
- ASCHERI, D. P. R.; BURGER, M. C. M.; MALHEIROS, L. V.; OLIVEIRA, V. N. (UNUCET/UEG) (2007): **Curvas de secagem e caracterização de hidrolisados de bagaço de cevada**. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/10/10-380-261.htm>>. Acesso em 04 de jun. 2016.
- BAMFORTH, C. W.; RUSSEL, I.; STEWART, G. **Handbook of alcoholic beverages series - Beer – A quality Perspective**.USA: Elsevier; 2009.
- BARROS, A. A.; BARROS, E. B. P. **A química dos alimentos: produtos fermentados e corantes**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química. 88p. - (Coleção Química no cotidiano), v. 4 p. 30-32. 2010.
- BOTELHO, B.G. **Perfil e teores de aminos bioativas e características físico-químicas em cervejas**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. UFMG. Belo Horizonte, MG. 2009.
- BRASIL, DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. **Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**, 2009.
- BRUNELLI, L. T. **Produção de cerveja com mel: características físico-químicas, energética e sensorial**. Tese (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu, Botucatu, SP, 2012.

- BRUNELLI, L. T., MANSANO, A. R., VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19-27, 2014.
- CAMPOS, V. B. et al. Caracterização física e química de frutos de maracujá-amarelo comercializados em Macapá, Amapá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.1, p.27-33, 2013.
- CARVALHO, L. G. **Produção de Cerveja**. Dossiê Técnico. REDETEC- Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTc>>. Acesso em: 02/05/16.
- CERVBRASIL, Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, 2014. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf>>. Acesso em: 02/05/16.
- CERVEJAS DO MUNDO. **História Da Cerveja**. Disponível em: <http://www.cervejasdomundo.com/Na_antiguidade.htm>. Acesso em: 08 de Março de 2016.
- CERVEZA ARTESANA. 2014. **Nuevos lúpulos**. Disponível em: <<http://cervezartesana.es/tienda/blog/nuevos-lupulos2.html>>. Acesso em: 17 de Março de 2016.
- CORDEIRO, L. G. **Caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte oriundo de cervejarias para fins energéticos**. Tese (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.
- CORDEIRO, L. G., EL-AOUAR, A. A., GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde**, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.
- COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n.2, p. 143-160. 2007.
- CURI, R. A. et al. Produção de cerveja utilizando cevada e maltose de milho como adjunto de malte: análises físico-química, sensorial e isotópica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 4, p. 279-287, 2008.
- DUARTE, J. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S.; VALENÇA, G. P.; NUNHEZ, J. R. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation, **AMB Express**, v. 3, n. 31, p. 3-8, 2013.
- DUARTE, J. C. **Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes no processo de fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade De Engenharia Química. Campinas – São Paulo. 2011.

- EBLINGER, H. M.; NARZIB, L. Beer, **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. 5, p. 178-220, 2012.
- FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 239-243, 1912.
- FONTANA, D. H. G. **Elaboração de um modelo para o controle do processo de pasteurização em cerveja envasada (In-Package)**. Tese (Mestrado), Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul - Porto Alegre, Junho de 2009.
- FREITAS, G. L. **Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum Vulgare L.*) e no bagaço de brassagem**. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.
- FREITAS, G. L., et al. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS E DPPH. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.3, p.303-307, 2006.
- GORINSTEIN, S. et al. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. **Nutrition Research**, v. 20, n. 1, p. 131-139, 2000.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.
- HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of brasilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 46, p. 1529-1537, 2011.
- HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 47, p. 2013-2024, 2012.
- HORNSEY, I. S. A. **History of beer and brewing**, RSC (RSC Paperbacks): The Royal Society of Chemistry, p. 75-82. 2003.
- IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1. ed. digital São Paulo: IMESP, 2008. Disponível em: http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf
- KIM, D-O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.
- KOSLOSKI, M. G., CANTERI, M. H. G. **Determinação de alguns parâmetros de qualidade na polpa dos frutos de maracujá-amarelo**. Programa de Iniciação Científica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. PONTA

GROSSA, 2012.

- LIMA, L.L.A. & FILHO, A.B.M. **Tecnologia de Bebidas**. Sistema Escola Técnica aberta do Brasil – e-Tec Brasil. Presidência da República Federativa do Brasil. UFRPE/CODAI. 2011.
- MARTINS, V.M.R. & RODRIGUES, M.Â. Produção e tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada. In: RODRIGUES, M. Â.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J.P.M. **Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio**. Livro de atas. Instituto Politécnico de Bragança. p.37-51. 2015.
- MATOS, R. A. G. **Produção de cervejas artesanais, avaliação de aceitação e preferência e panorama do mercado**. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Universidade Federal de Santa Catarina, 90 p., 2011.
- MEGA, J. F.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. A Produção da cerveja no Brasil. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 4, p. 426, 1959.
- NASCIMENTO, M.G.; ZANOTTO, S.P. & MELEGARI, S.P. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 567–571, 2002.
- OLIVEIRA, M. E. S. **Elaboração de bebida alcoólica fermentada de cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC) empregando leveduras livres e imobilizadas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais – Brasil. 2010.
- PORTO, P. D. **Tecnologia de fabricação de malte: uma revisão**. Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos. Porto Alegre, 2011.
- PRASAD, M. P. In-vitro evaluation of antioxidant properties of fermented fruit beer samples, **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 11, p. 1545-1550, 2014.
- RAMPAZZO, V. **Caracterização da composição fenólica e capacidade antioxidante de cervejas comerciais de diferentes processos de fermentação**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, 2014.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation de colorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–

1237, 1999.

- REBELLO F. F. P. Produção de Cerveja. **Revista Agrogeo ambiental**, p. 145-155, 2009.
- RIO, R. F. **Desenvolvimento de uma cerveja formulada com gengibre (*Zingiber officinalis*) e hortelã do Brasil (*Mentha arvensis*): avaliação de seus compostos bioativos e comparação com dois estilos de cerveja existentes no mercado.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Rio de Janeiro, 69 p., 2013.
- ROSA, N. A. & AFONSO, J. C. A Química da Cerveja. **Química Nova Escola**, v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.
- SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. **Cervejas e refrigerantes.** São Paulo: CETESB, 58 p., 2005. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf>. Acesso em: 02/05/16.
- SIPOLI, C. C., BARROS, S. T. D. Concentração do suco de maracujá por osmose inversa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n.2, p.187-195, 2011.
- SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, v.19, p.491-498, 2008.
- SIQUEIRA, S. 2014. **Cervejas industriais ficaram 40% menos amargas nos últimos 20 anos, aponta estudo.** Disponível em: <<http://www.siqueiranews.com/2014/08/cervejas-industriais-ficaram-40-menos.html>>. Acesso em: 17 de Março de 2016.
- SLEIMAN, M. & VENTURINI FILHO, W. G. Utilização de extratos de malte na fabricação de cerveja: avaliação físico-química e sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n.2, p.145-153, 2004.
- SMOGROVICOVÁ, D., DÖMÉNY, Z., JURAJ SVITEL, J. Modeling of saccharide utilization in primary beer fermentation with yeasts immobilized in calcium alginate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 94, p. 147-158, 2001.
- SOARES, R. M. D.; FRANCISCO, A.; RAYAS-DUARTE, P.; SOLDI, V. Brazilian hull-less and malting barley genotypes: Chemical composition and partial characterization, **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 3, p. 357-371, 2007.
- SOUSA, L.F. G. et al. **Estudo da secagem do bagaço de malte para aplicação em formulação de pré-mistura para pão cervejeiro.** 4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente. Bento Gonçalves, 2014.

- SPITAELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented Lambic Beer, **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2014.
- TAFULO, P. A. R. **Capacidade antioxidante de cervejas comerciais**. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Instituto Politécnico do Porto, 2008.
- TUPINAMBÁ, D. D. et al. Caracterização físico-química e funcional de polpas de híbridos comerciais de *Passiflora Edulis F. Flavicarpa Deg* da safra outubro / 2007 sob diferentes condições de armazenamento. **IX Simpósio Nacional do Cerrado - II Simpósio Internacional Savanas Tropicais**. Brasília, DF. 2008.
- VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Cerveja**. 1ed. Jabotical: Funep, 2000.
- VENTURINI FILHO, W.A.; CEREDA, M.P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W.; LIMA; A. U. **Biотecnologia Industrial– Biотecnologia na Produção de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher. p. 91-143. 2001.
- VERAS, M. C. M., PINTO, A. C. Q., MENESES, J. B. influência da época de produção e dos estádios de maturação nos maracujás doce e ácido nas condições de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.959-966, 2000.
- VIEIRA, G. P. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp.** Dissertação (Mestrado), USP, São Paulo, 2013.
- YALÇIN, E.; ÇELIK, S.; AKAR, T.; SAYIM, I.; KÖKSEL, H. Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey, **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p.171-176,2007.
- ZHOU, Z.; LI, G.; LI, Y. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 21-26, 2010.
- WILSON, E. D.; SANTOS, A. C.; VIEIRA, E. C. Energia. In: DUTRA-OLIVEIRA, J. E.; SANTOS, A. C.; WILSON, E. D.; **Nutrição Básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. p. 80-94.